



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE AGRONOMIA**

**ANDRÉIA PEREIRA DOS SANTOS**

**INFLUÊNCIA DA TROCA GASOSA E CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE NA  
FASE DE BULBIFICAÇÃO *IN VITRO* DE *Allium sativum L***

**UBERLÂNDIA – MG  
2021**



**ANDRÉIA PEREIRA DOS SANTOS**

**INFLUÊNCIA DA TROCA GASOSA E CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE NA  
FASE DE BULBIFICAÇÃO *IN VITRO* DE *Allium sativum L***

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado referente ao Curso de  
Agronomia, da Universidade Federal de  
Uberlândia, para obtenção do grau de  
Engenheira Agrônoma.

**Orientador:** Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz

**UBERLÂNDIA – MG  
2021**



**ANDRÉIA PEREIRA DOS SANTOS**

**INFLUÊNCIA DA TROCA GASOSA E CONCENTRAÇÕES DE SACAROSE NA FASE  
DE BULBIFICAÇÃO *IN VITRO* DE *Allium sativum L***

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado referente ao Curso de  
Agronomia, da Universidade Federal de  
Uberlândia, para obtenção do grau de  
Engenheira Agrônoma.

Aprovado pela Banca Examinadora em 06 / 11 / 2021

---

Msc. Maria Silva Pereira de Paula  
Primeiro Membro da Banca

---

Dra. Rayssa Camargo de Oliveira  
Segundo Membro da Banca

Orientador: \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz

## **DEDICATÓRIA**

A Deus, aos meus pais, minhas irmãs, ao meu namorado e amigos que tanto me incentivaram e apoiaram durante todo o processo, que ficaram felizes a cada vitória e me ajudaram a superar os obstáculos com muito amor e empatia.

## AGRADECIMENTOS

- Primeiramente a Deus, pois sem fé e amparo nos momentos difíceis eu não conseguiria, chegar até aqui.

- Ao meu orientador Dr. José Magno Queiroz Luz, pela confiança, dedicação, amizade e pelos muitos ensinamentos na realização deste trabalho;

- À empresa Agrícola Wehrmann pela concessão de material e ajuda de custo necessárias para realização deste trabalho;

- À coordenadora do laboratório de cultura de tecidos de alho e batata da empresa Agrícola Wehrmann, Mariana Silva de Paula e ao ex coordenador do mesmo laboratório, o senhor José de Almeida Júnior, pela ajuda, confiança, pelo apoio e ensinamentos transmitidos na realização desta pesquisa;

- À minhas colegas de laboratório, Camilla Ferreira, Rayssa Camargo e Carla Gonçalves pela ajuda, ensinamentos e conhecimentos trocados durante o desenvolvimento de nossos trabalhos;

- A minha família, meus pais Leonida e Alberto e minhas irmãs Sarah e Magda, e a minha tia Odete, por sempre me ajudarem nos momentos de aflição e acreditarem em mim, pela paciência, amor e carinho e por me darem todo suporte e apoio para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho;

- Aos meus amigos e companheiros: Natália Bissiato, Ornelle Cristiane, Lucas Santos, Lourrane Lima, Ione Monteiro, Luana Nunes, Mickell Campos e Vinycius Naves, por toda ajuda, apoio, incentivo, amizade e muita paciência em todos os momentos;

- E em especial ao meu namorado Jardel Wierzbicki, por sempre acreditar em mim, mais que eu mesma na maioria do tempo, por toda ajuda, carinho, amor e paciência, não só durante a realização deste trabalho mas durante toda minha trajetória acadêmica.

- Ao meu psicólogo, Dr. Marcelo Lima por me ajudar manter a sanidade mental durante o fim deste processo que não foi nada fácil.

Obrigada a todos que fizeram e fazem parte da minha jornada, tenho certeza que cada pessoa foi um anjo enviado de Deus para me guiar, ensinar, apoiar e cuidar.

A palavra para tudo isto é GRATIDÃO, GRATIDÃO, GRATIDÃO.

## RESUMO

SANTOS, Andreia Pereira. **Influência da troca gasosa e concentrações de sacarose na fase de bulbificação *in vitro* de *Allium sativum* L.** 2021. 20f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2021.

O alho (*Allium sativum* L.), é uma espécie propagada vegetativamente, e por esse motivo facilita a disseminação de patógenos, como vírus, favorecendo o aparecimento de doenças, o que acarreta na diminuição da produtividade e da qualidade do produto. Uma vez que não se pode lançar mão de variedades de alho resistentes e/ou tolerantes no Brasil, o manejo de viroses a campo é dificultado, e por isso o processo de limpeza clonal é a medida que mais se destaca no controle das viroses em plantas de alho, mais precisamente a cultura de meristemas. Mas devido as especificidades de cada cultivar torna-se necessário o ajuste dos protocolos já existentes para as cultivares de interesse, partindo disso, objetivou-se com o presente trabalho investigar influência de diferentes concentrações de sacarose adicionadas ao meio de cultivo, bem como compreender o efeito da troca gasosa no microambiente, sobre as características produtivas das cultivares de alho nobre Ito e Quitéria, cultivadas *in vitro*. Para isso realizou-se dois experimentos, para ambos foram adotados o delineamento em blocos, sendo que para o primeiro experimento onde foi estudado o efeito do microambiente, foram combinadas três tipos de tampas: sem furo, 1 furo e 2 furos, com esquema fatorial 2x3 com 6 tratamentos e 15 repetições, e para o segundo experimento, foram combinadas 6 concentrações diferentes de sacarose (0, 2, 4, 6, 8 e 10%) com as cultivares Ito e Quitéria, Adotou-se delineamento experimental em blocos casualizados com esquema fatorial 2x6 totalizando 12 tratamentos com 5 repetições. Cada parcela experimental foi composta por um pote plástico contendo 6 explantes. As Características analisadas foram :Massa fresca de parte aérea (MFPA), Massa fresca de Raiz (MFR), Massa fresca de Bulbo (MFB), Número de bulbos por planta (NBP) e Diâmetro de bulbo (DB) e taxa de bulbificação. A partir da análise dos dados obtidos, ficou evidente que existe correlação negativa forte entre plantas de alho para as características MFR e MFPA com NBP e MFB. Para o experimento de microambiente, pode-se afirmar que o melhor tratamento foi quando se utilizou tampas sem furo, uma vez que não se diferiu estatisticamente para NBP e MFB e ainda se mostrou o tratamento menos oneroso, além de diminuir o risco de contaminação, Com relação ao experimento de diferentes concentrações de sacarose, a concentração de 8% se mostrou a que reúne maiores rendimentos das características de interesse DB, NBP e MFB, assim como a concentração de 10% no entanto a 8% além de um menor gasto com este insumo, diminui-se também a risco de contaminações por fungos.

**Palavras-chave:** Alho, Microambiente, Microbulbos, Ito, Quitéria.

## ABSTRACT

Garlic (*Allium sativum* L.) is a vegetatively propagated species, and for this reason it facilitates the dissemination of pathogens, such as viruses, favoring the appearance of disease, resulting in reduced productivity and product quality. Since resistant and/or tolerant garlic varieties cannot be used, the management of viruses in the field is difficult, and for this reason the clonal cleaning process is the most outstanding measure in the control of viruses in garlic plants, more precisely the culture of meristems. But due to the specificities of each cultivar, it is necessary to adjust the existing protocols for the cultivars of interest. Therefore, the aim of this study was to investigate the influence of different concentrations of sucrose added to the culture medium, as well as to understand the effect of gas exchange in the microenvironment on the productive characteristics of noble garlic cultivars Ito and Quitéria, cultivated *in vitro*. The effect of the microenvironment, three types of lids were combined: no hole, 1 hole and 2 holes, with a 2x3 factorial scheme with 6 treatments with 15 replications, and for the second experiment, 6 different sucrose concentrations were combined (0, 2, 4, 6, 8 and 10%) with the cultivars Ito and Quitéria, adopting a randomized block experimental design with a 2x6 factorial scheme with 12 treatments. with 5 repetitions. Each experimental plot consisted of a plastic pot containing 6 explants. The characteristics analyzed were: Fresh aerial part mass (MFPA), Fresh root mass (MFR), Fresh bulb mass (MFB), Number of bulbs per plant (NBP) and Bulb diameter (DB). From the analysis of the data obtained, it was evident that there is a strong negative correlation between garlic plants for the characteristics MFR and MFPA with NBP and MFB. For the microenvironment experiment, it can be said that the best treatment was when caps without holes were used, since it did not differ statistically for NBP and MFB, it still proved to be the least costly treatment, in addition to reducing the risk of contamination, Regarding the experiment of different concentrations of sucrose, the concentration of 8% was shown to have the highest yields of the characteristics of interest DB, NBP and MFB, as well as the concentration of 10% however to 8% in addition to a lower expense with this input also reduces the risk of contamination with fungi

Keywords: Garlic, Microenvironment, Microbulbs, Ito, Quitéria.

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

- Tabela 1.** Esquema experimental tipo de tampa X cultivar ..... 22
- Tabela 2.** Diferentes contrações de sacarose X cultivar ..... 22
- Tabela 3.** ANOVA das características: Massa Fresca de Parte Aérea (MFPA), Massa Fresca de Raíz (MFR), Massa Fresca de Bulbo (MFB), Número de Bulbo por Planta (NBP) e Diâmetro de Bulbo (DB) das plântulas *in vitro* de alho (*Allium sativum*) em microambiente com um, dois e sem furos na tampado frasco. Uberlândia-MG, 2020..... 23
- Tabela 4.** Teste de Média para as variáveis Número de Bulbo por Planta (NBP), Massa Fresca de Raíz (MFR), Massa Fresca de Parte Aérea (MFPA), Massa Fresca de Bulbo (MFB) em função das cultivares Ito e Quitéria. Uberlândia – MG, 2020.....24
- Tabela 5.** Teste de Média para as variáveis Número de Bulbo por Planta (NBP), Massa Fresca de Raíz (MFR), Massa Fresca de Parte Aérea (MFPA), Massa Fresca de Bulbo (MFB) e Massa Fresca Total (MFT) em função do microambiente com um, dois e sem furos na tampa do frasco. Uberlândia-MG, 2020..... 24
- Tabela 6.** Teste de Média para a variável Diâmetro de Bulbos (DB) em função do microambiente com tampas contendo: um, dois e sem furos na tampa do frasco e cultivares Ito e Quitéria. Uberlândia-MG, 2020 ..... 25
- Tabela 7.** ANOVA e análise não paramétrica (rank) avaliando das características, Massa Fresca de Parte Aérea (MFPA), Massa Fresca de Raíz (MFR), Massa Fresca de Bulbo (MFB), Número de Bulbo por Planta (NBP) e Diâmetro de Bulbo (DB) das plântulas *in vitro* de alho (*Allium sativum*) em função e diferentes concentrações de sacarose para as cultivares Ito e Quitéria. Uberlândia-MG, 2020..... 27
- Tabela 8.** Teste de média para a variável Diâmetro de Bulbo (DB) em função das cultivares Ito e Quitéria. Uberlândia-MG, 2020..... 27

<b>Tabela 9.</b>	Teste de média para as variáveis Diâmetro de Bulbo (DB) e Massa Fresca de Bulbo (MFB) em função de diferentes concentrações de sacarose. Uberlândia- MG, 2020.....	28
<b>Tabela 10.</b>	Teste de média da interação dos fatores: diferentes concentrações de sacarose e as cultivars, Ito e Quitéria. Uberlândia-MG, 2020.....	29
<b>Figura 1.</b>	Correlação de Pearson para as características: Massa Fresca de Parte Aérea (MFPA), Massa Fresca de Raíz (MFR), Massa Fresca de Bulbo (MFB), Número de Bulbo por Planta (NBP) e Diâmetro de Bulbo (DB), para plântulas de alho cultivadas <i>in vitro</i> .....	31

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>12</b>
2.1. <i>Allium sativum L</i> .....	13
2.2. <i>Cultura de tecidos</i> .....	16
2.3. <i>Sacarose na indução de bulbificação in vitro</i> .....	18
2.4. <i>Efeito da troca gasosa no microambiente</i> .....	20
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>31</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>31</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O panorama atual do mercado consumidor de alho no Brasil, mostra que no ano de 2020, o consumo de alho atingiu o volume de 36 milhões de caixas de 10 kg. Entretanto cerca de 55% de todo esse alho que foi consumido, foi produto de importação, principalmente de origem Chinesa e Argentina, esses números deixam claro, que a produção nacional ainda não consegue suprir nem a metade da demanda interna, mesmo assim a cultura do alho vem se mostrando em expansão nacional, isso pode ser evidenciado pelo aumento da área plantada de 9.500 hectares em 2016 para 14 mil hectares, em 2020, e as projeções futuras são de diminuir drasticamente as importações de alho no Brasil, isso porque esse alto volume de importações acabam pressionando os preços internos, e deixando o produtor Brasileira em desvantagem com essa competição entre preço e qualidade, dado que o alho nobre brasileiro tem uma qualidade muito superior quando comparado aos que são importados, no entanto o seu custo de produção é proporcionalmente mais elevado. (ANAPA, 2021; RUBIN, 2020).

Nessa corrida para diminuição das importações os produtores Brasileiros têm alternativas limitadas para toranar o alho nobre nacional cada vez mais competitivo e uma delas é apostar no aumento da qualidade do produto oferecido ao consumidor, no entanto um fator limitante para alcançar esse objetivo são os complexos virais que se acumulam no alho produzido no campo geração após geração (RESENDE, 2018).

O alho (*Allium sativum* L.), é uma espécie propagada vegetativamente, e por esse motivo a disseminação de patógenos é facilitada, dentre esses patógenos, os vírus apresentam um destaque especial, uma vez que esses complexos virais acarretam na diminuição da produtividade e da qualidade do produto. Devido à particularidades da própria espécie o lançamento de variedades de alho resistentes e/ou tolerantes a vírus é algo que ainda não foi alcançado, e por esse motivo o manejo de viroses a campo é dificultado, de modo que o processo de limpeza clonal é a medida que mais se destaca no controle das viroses em plantas de alho, mais precisamente a técnica de cultura de meristemas. Esse processo permite quebrar o ciclo de replicação dos vírus e resgatar as plantas da degenerescência viral, em uma taxa de eficiência média de 80 a 95% de plantas livres de vírus (LV), O cultivo de meristemas consiste basicamente excisão de uma única parte da planta não infectada por vírus, a qual apresenta elevada velocidade de multiplicação e ausência de um sistema vascular, o que impede disseminação viral no tecido regenerado. (CARVALHO & VIDAL, 2003; MENEZES JÚNIOR, 2011).

A micropropagação tem sido a técnica de cultivo *in vitro* mais utilizada para obtenção

de plantas livre de vírus (LV), por oferecer um grande potencial para multiplicação rápida e massal, em período de tempo e espaço físicos reduzidos, além de possibilitar a obtenção de plantas com excelente estado fitossanitário. Entretanto para o sucesso da micropropagação é necessário que o ambiente seja estéril e tenha as condições ambientais controladas com o máximo de rigor possível (LAMEIRA et al., 2000).

Um dos fatores intimamente ligados ao sucesso da técnica é o domínio da tecnologia de propagação em laboratório, bem como os fatores que afetam o crescimento e o desenvolvimento das plantas *in vitro*, tais como: a composição dos meios de cultura de tecidos, bem como o seu balanço hormonal, concentração de sacarose, utilização de agentes osmóticos, permeabilidade a trocas gasosas no microambiente e condições externas como fotoperíodo, temperatura e limpeza do ambiente, todos esse fatores devem estar harmonicamente bem estabelecidos e controlados pois se somam para o sucesso da micropropagação. (DE ANDRADE, 2002).

Além dos cuidados supracitados, existe um outro fator intimamente ligado ao êxito da micropropagação, que é a especificidade de cada espécie e cultivar que é submetida a esta técnica, visto que cada uma delas apresentam uma demanda tanto nutricional, quanto de condições ambientais distintas. Partindo do exposto e levando em consideração a escassez de protocolos disponíveis na literatura no que se refere à qualidade do alho semente produzido, o objetivo com este trabalho foi verificar a influência da troca gasosa e concentrações de sacarose na fase de bulbificação *in vitro* das cultivares Ito e Quitéria de *Allium sativum L.*, para otimizar e adaptar o protocolo de cultivo em larga escala de alho via micropropagação para as cultivares supracitadas.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

Uma pesquisa nasce da necessidade em solucionar um problema vigente. A ciência agrária é uma área em vasta extensão, visto que a demanda por alimentos e insumos utilizados pela indústria continuam a aumentar na contemporaneidade. Esse cenário mundial apresenta-se como uma forte justificativa para que pesquisas nessa área sejam realizadas e, até mesmo, incentivadas. Nesse sentido, antes de se iniciar as discussões referentes a este estudo, o qual tem por objetivo verificar a influência da troca gasosa e diferentes concentrações de sacarose na fase de bulbificação *in vitro* de das cultivares Ito e Quitéria de *Allium sativum L.*, para otimizar e adaptar o protocolo de cultivo em larga escala de alho via micropropagação, é necessário a realização de uma revisão da literatura

a fim de garantir um dos aspectos mais importantes das pesquisas científicas: a originalidade. Logo, nos próximos tópicos, será abordado o que a literatura já apresenta sobre a espécie *Allium sativum L.*, meios de cultura, microambiente e a influência da sacarose nesse tipo de cultura.

## 2.1 *Allium sativum L.*

Nomeado pela botânica como *Allium sativum L.*, o alho, conforme é conhecido popularmente, é cultivado em todo o mundo com destaque para países como a China, Espanha e Argentina. Apesar de o Brasil possuir uma posição de destaque no que tange a produção dessa espécie, o alto consumo nacional faz com que a importação do produto ocorra em grande escala. Segundo a ANAPA (Associação Nacional dos Produtores de Alho), “O Brasil consome cerca de 30 milhões de caixas de alho (cx. 10 kg), ou 300.000 toneladas”, sendo que produz menos de 50% desse número. Dentre a produção nacional, os estados de Goiás, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Santa Catarina lideram o ranking, ao fornecerem aproximadamente, 90% do alho comercializado em território brasileiro.

Em 2018, segundo dados do IBGE (2020), (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), esses estados produziram 118 mil toneladas, em 10,5 mil ha. A produtividade média entre os maiores estados produtores é muito variável. Enquanto Goiás e Minas Gerais atingem entre 12 a 16 t./ha, nos estados da região Sul o rendimento varia de 5,0 a 9,0 toneladas. Além de haver a urgência em incentivos fiscais e estímulos a pesquisas que melhorem e aumentem a produção nacional, o governo, na tentativa de conter a importação do produto a um valor inferior do praticado internamente pelo país, instituiu a Lei nº 9.019, de 30 de março de 1995, que dispõe sobre a aplicação dos direitos previstos no Acordo *Antidumping*.

As medidas *antidumping* têm por finalidade evitar que a importação de produtos ocorra de maneira que prejudique o país receptor, dessa maneira, impede que a compra de produtos no exterior cause danos à economia local, pois faz com que o valor seja superior ao praticado no mercado nacional. Ainda assim, conforme já mencionado, o Brasil ainda não possui capacidade de manufatura compatível com o consumo atual. Um dos fatores que impactam diretamente essa perspectiva é a baixa qualidade das sementes produzidas, o que evidencia a premência na otimização desses processos.

Vieira (2012) faz uma descrição macroscópica dessa espécie que é propagada vegetativamente. Para o autor, o *A. sativum L.* é uma espécie diplóide ( $2n = 16$ ), da família

Alliaceae, ordem Asparagales (Brewster, 2008). *A. sativum* é uma planta herbácea com hábito bulbosa, com haste esférica, podendo atingir de 0,40 - 0,80 m de altura (Menezes Sobrinho, 1984; Biasi & Mueller, 1999). Na haste, carrega um grande número de folhas com distintos arranjos de arquitetura. Possui folhas lanceoladas, com o limbo medindo de 0,20 a 0,50 m de comprimento. O pseudocaule é formado pelas bainhas das folhas, as quais se implantam em um caule pequeno e achatado, situado na base do bulbo, denominado disco basal (Burba, 1983). Um bulbo de alho é formado por bulbilhos (dentes), normalmente em números de 4 a 20, dependendo do tipo e cultivar, rodeado por algumas túnicas (bainhas de folhas secas), que correspondem à parte basal da folhagem da planta (VIEIRA, 2012, p. 37).

A quantidade de bulbilhos tornou-se uma das características mais importantes a respeito do alho, visto que esse dado interfere até mesmo na classificação da cultivar. De acordo com a revisão de literatura de Vieira (2012, p. 39), predominam no Brasil, “basicamente dois grupos de cultivares de alhos: “comuns”, formado por cultivares de ciclo precoce (120 a 149 dias), e “nobres”, formado por cultivares de ciclo tardio (150 a 180 dias), do plantio a colheita dos bulbos, variando conforme a cultivar utilizada”. Outra característica que pode ser atribuída a esses dois grupos é o fato de o alho comum possuir coloração predominante branca, enquanto que o alho nobre possui coloração predominante roxa, o que se mostra um atrativo aos olhos dos consumidores e faz com que o alho nobre tenha maior valor de mercado.

Assim, nas últimas décadas, a busca pelo melhoramento genético por parte dos produtores de alho aumenta cada vez mais. Entretanto, algumas peculiaridades da espécie dificultam esse processo, o que faz com que pesquisas que visem esse melhoramento ainda sejam necessárias e urgentes. Um fator de impacto nesse processo seria o aspecto reprodutivo da planta que limita a forma de melhoramento clássica: o cruzamento para o alcance de novas cultivares por meio de melhores variações genéticas (VIEIRA, 2012). Esse autor ainda nos explica que “A propagação do alho tem sido feita assexuadamente por meio de bulbilhos retirados da base da planta, ou por bulbilhos aéreos das inflorescências”, entretanto algumas dificuldades foram mapeadas, como

a degeneração de órgãos florais por não conseguirem competir com o rápido desenvolvimento de bulbilhos vegetativos aéreos; a degeneração de micrósporos antes da mitose (Kenel et al., 2010); a existência de doenças degenerativas, como as causadas por vírus e micoplasmas, interferindo na reprodução sexual (Jenderek & Hannan, 2004); as

anomalias morfológicas encontradas nas flores de alho que ocorreram associadas à esterilidade (Etoh & Ogura, 1977) e a produção de gametas balanceados que estaria sendo reduzida significativamente devido ao acúmulo de aberrações cromossômicas, como aneuploidia, translocação e/ou inversões, dado o fato da espécie ter sido propagada assexuadamente por muitas gerações (VIEIRA, 2012, p. 38).

Diversos são os aspectos que dificultam o melhoramento genético, pois incidem sobre a possibilidade de obter uma maior variabilidade genética. A esterilidade dos híbridos aparece como um dos principais problemas a ser combatido até mesmo entre os híbridos que apresentaram fertilidade, conforme estudos de Pooler e Simon (1993). Tornou-se evidente, portanto, que o melhoramento genético somente se efetivaria caso os pesquisadores tivessem acesso a uma ampla diversidade genética, porém, conforme já mencionado, aqui no Brasil, há apenas dois grupos em cultivo: o comum e o nobre, os quais, apesar de pertencerem a grupos distintos, ainda são geneticamente semelhantes.

Além do aspecto reprodutivo, o clima é uma circunstância importante para o bom crescimento e produção de uma semente de qualidade. Burba (1993) explica que a capacidade de um bulbo se transformar em uma nova planta está intimamente relacionada ao clima. Em seus estudos, Burba (1983) afirma ainda que “as áreas frias das latitudes austrais, em nosso hemisfério, se mostram as mais promissoras para se obter alho de boa qualidade, e que estas mesmas características fotoperiódicas são vantajosas para a produção de alho-semente. Isso significa que temperaturas amenas beneficiam a emergência do bulbo-semente, seu desenvolvimento inicial, e o estímulo para bulbificação, já a fase de desenvolvimento e maturação do bulbo, as temperaturas mais elevadas satisfazem melhor a produção da planta (VIEIRA, 2012, p. 40).

Como citado por Zewdie et al. (2005) existe uma carência no mercado em novas cultivares de alho disponíveis aos produtores, e isso se deve a grande escassez em programas de melhoramento para a espécie *Allium sativum*, como principal fator, cita-se a ausência de recombinação genética pelo processo meiótico, em decorrência de ser o alho, botanicamente, de propagação assexuada. E por esse motivo a cultura é conhecida pela dificuldade de manutenção de qualidade fitossanitária, no decorrer das gerações em quem são cultivadas.

Uma vez que, depois dos fungos, os agentes virais são os principais problemas fitossanitários da cultura do alho, em razão dos eficientes mecanismos de disseminação, via bulbos-semente e/ou por ácaros e insetos, principalmente afídeos, e sendo uma espécie propagada vegetativamente, favorece o acúmulo de vírus. Como efeito da

infecção, a planta de alho geralmente sofre degenerescência e apresenta menor desenvolvimento, característica do baixo vigor vegetativo com a redução no tamanho da planta, menor peso dos bulbos e bulbilhos produzidos, reduzindo a longevidade dos bulbos armazenados (Resende et al., 1995). Dentre o complexo viral presente na cultura do alho, existe um destaque para três gêneros específicos, que são: *Potyvirus*, *Carlavirus* e *Allexivirus* (Dovas et al., 2001; Fajardo et al., 2001; Shibolet et al., 2001; Conci et al., 2002; Koo et al., 2002; Takaki et al., 2005; Melo Filho et al., 2006). Com a dificuldade de para se estabelecer programas de melhoramento e com essa degenerescência do material propagado, uma alternativa viável para limpeza viral e recuperação do vigor e produtividade do material, é a cultura de meristemas, via micropropagação de cultura de tecidos desses ápices caulinares.

Entretanto é importante ressaltar que, para cultura de tecidos é de extrema importância o controle das condições ambientais, tanto *in vitro*, quanto *ex vitro*. Portanto, no próximo tópico, antes de adentrar a discussão acerca da cultura de tecido, sé importante se atentar aos aspectos sanitários que se apresentam como um dos principais obstáculos nas técnicas de melhoramento dessa cultivar.

## **2.2 Cultura de tecidos**

O fato de a maioria dos complexos virais não ocasionarem a morte do *Allium sativum* L fez com que, por muito tempo, esse fosse um problema inexplorado. Contudo, nas últimas décadas, os aspectos fitossanitários da cultura do alho vem sendo investigados, pois uma das conclusões a que chegaram os pesquisadores, é que a grande quantidade de vírus encontrada nas plantas são passadas por distintos ciclos de cultivo. Resende *et al.* (1999, p.119) complementam que

A propagação exclusivamente assexuada é outro sério entrave dessa cultura, pois permitiu que patógenos e pragas se disseminassem com facilidade através das gerações de cultivo, causando a degenerescência generalizada dos clones comerciais. Entre os patógenos, destacam-se os vírus, em função do seu potencial de reprodução, facilidade de transmissão, perpetuação na cultura e principalmente pela grande dificuldade de controle.

Devido a isso, a cultura de tecido por meio *in vitro* aparece como umas das maneiras mais eficazes de clonagem genética com baixo índice de contaminação viral. A cultura de tecidos pode ser conceituada como “um conjunto de técnicas nas quais um explante (célula, tecido ou órgão) é isolado sob condições assépticas, em meio nutritivo artificial” (PASQUAL et al., 2008, p.45). Esse tipo de prática somente é possibilitada por meio do princípio do totipotencialidade das células, em que toda célula vegetal carrega todas as informações genéticas capazes de reproduzir a totalidade da planta.

De acordo com a EMBRAPA (2008), há três fatores cruciais que determinarão a qualidade de regeneração da planta, os quais são: o genótipo, a fonte de explante e a condição da cultura. A escolha do genótipo mostra-se crucial ainda que as características genéticas do *Allium sativum L* sejam semelhantes, entretanto essa escolha deve estar alinhada com os objetivos do pesquisador ao manipular as células deste genótipo. Da mesma forma, a fonte de explante, ou seja, qual será a parte da planta utilizada para a regeneração impacta diretamente sobre a qualidade do processo. Em pesquisas que visam o melhoramento do alho, Vieira (2012, p. 57) determina que “a constituição genética da planta depende da família, e esta, principalmente, determina o tipo de explante que é mais comumente usado”.

Por fim, o terceiro aspecto apresentado pela EMBRAPA (2008) são as condições de cultura, especificamente, o meio de cultura. Podemos conceituar o meio de cultura como sendo constituído por “sais minerais (micro e macronutrientes), nitrogênio reduzido, uma fonte de carbono, vitaminas e reguladores de crescimento, necessários para manter a divisão celular e a proliferação dos explantes” (EMBRAPA, 2008, p. 11). Além desses, há outras particularidades das condições que devem ser avaliadas, como a luz, temperatura e o vasilhame.

A cultura de tecidos pode ocorrer por diferentes técnicas, mas, geralmente para a cultura do alho especificamente, possuem como objetivo a limpeza viral para se livrar das viroses e possibilitar um melhoramento genético do alho-semente. Sabe-se que quando atingidas por algum tipo de vírus, em sua maioria, a planta está infectada com mais de um tipo e apresenta sintomas como os citados por Resende (1999, p. 119), “Nanismo, amarelecimento em forma de mosaico e redução acumulativa do vigor e da produção são sintomas característicos de infecção viral em plantas”.

Deste modo, o uso da micropropagação tornou-se comum com o objetivo de conservar o germoplasma, transformação genética, dentre outros (VIEIRA, 2012, p. 56). No entanto, a prática que se mostrou mais efetiva foi a técnica de cultura de tecidos

denominada limpeza clonal, sobretudo, por utilizar a cultura de meristema como fonte de explante. Contudo, a técnica esbarra em um fator limitante que é a obtenção de meristema sem que haja dano ou a dificuldade de regeneração da planta. Assim, coloca-se como restrição a obtenção de “meristemas apicais reduzidos, sendo recomendados tamanhos entre 0,1 a 0,3 mm” (VIEIRA, 2012, p. 56). Logo, percebe-se que a cultura de tecido vegetal ainda necessita de pesquisas que consigam perscrutar alguns processos para que a realidade “planta livre de vírus” seja uma realidade no Brasil.

Para o estabelecimento da cultura de meristemas como rotina no laboratório é necessário aprimorar os protocolos já existentes para pleno desenvolvimento das plantas completas até a bulbificação *in vitro*, evitando perdas durante a aclimação das plantas (KIM et al., 2003). Entretanto esses protocolos devem ser ajustado levando em consideração as especificidades de cada cultivar com que se está trabalhando, e a concentração de sacarose no meio de cultivo na etapa de bulbificação das diferentes cultivares, vem sendo um objeto de estudo em muitos trabalhos.

### **2.3 Sacarose na indução de bulbificação *in vitro***

A composição genética da planta, bem como os reagentes utilizados na suplementação do meio de cultivo, juntamente com as condições ambientais, são os principais fatores que exercem influência direta na indução e crescimento de órgãos de reserva *in vitro*. (Ascough et al., de 2008).

No que tange a constituição do meio de cultura, deve-se atentar tanto no tipo, quanto concentração das formulações salina, reguladores de crescimento vegetal, carboidratos fornecidos, o agente gelificante, bem como adição de outros novos agentes, uma vez que todos esses componentes podem ser ajustados para a indução de órgãos de armazenamento em uma determinada espécie vegetal (Medina et al., 2009).

A sacarose é considerada a melhor fonte de carbono para cultura de tecidos de plantas *in vitro* (George & Sherrington, 1984). Geralmente, a sacarose é hidrolisada, parcial ou totalmente no meio de cultura para os monossacarídeos glicose e frutose, que são absorvidos pelos tecidos da planta. Contudo, poucos trabalhos têm sido dedicados aos efeitos destes monossacarídeos sobre o crescimento de espécies bulbosas. Em plantas de alho regeneradas *in vitro*, a sacarose é um fator importante na indução de bulbos, segundo vários pesquisadores (Nagakubo et al., 1993; Ravnkar et al., 1993; Mohamed-Yansseen et al., 1994).

Zel et al. (1997) relataram uma dependência da sacarose para formação de bulbos na base de plantas micropropagadas *in vitro*, ao observarem que a sacarose poderia induzir a formação de bulbos a partir de fragmentos do disco basal de bulbilhos de alho e demonstraram que a adição de AJ no meio de cultura com 8% de sacarose foi superior na formação de bulbo.

Nessa mesma linha de estudo, Ravnikar et al. (1993) relataram um efeito sinérgico entre AJ e sacarose, apenas em relação ao número de bulbos formados, não afetando o seu diâmetro, porém, maior concentração de sacarose (8%), por si só, aumentou em 20% o diâmetro do bulbo em meio sem a presença de AJ.

Após o desenvolvimento inicial de plântulas de alho em meio contendo 2iP, Torres et al. (2000) obtiveram bulbilhos com diâmetro entre 5 a 8 mm em meio MS suplementado com 6% de sacarose. O efeito estimulante da alta concentração de sacarose na formação de bulbo também foi observado para *A. cepa* (Keller, 1993).

Bach et al. (1992), testaram os efeitos de diferentes fontes de carboidratos sobre a formação de bulbos de *H. orientalis* usando folhas como explantes e constataram que meios com 30g L<sup>-1</sup> de frutose produziram mais bulbilhos. O uso de concentrações crescentes dos monossacarídeos frutose e glicose, isoladamente, ou em mistura equimolar estimularam maior produção e acúmulo de massa seca de bulbos de *Narcissus spp* (Staikidou et al., 2005).

Vieira (2012) relatou que as variáveis número de bulbos por planta, porcentagem de bulbificação e diâmetro e massa fresca de bulbo responderam positivamente ao aumento da concentração de sacarose e de frutose no meio de cultura até o nível de 9%, exceto o número de bulbos por planta que teve o valor máximo de 1,6 bulbos, alcançado com 3% de sacarose.

Kim et al. (2003) obtiveram sucesso na indução da bulbificação *in vitro*, utilizando como estresse hídrico o aumento do potencial osmótico do meio de cultura adicionando concentrações de sacarose (50 a 110 g L<sup>-1</sup>). No trabalho realizado por Longo et al (2012) a micropropagação e bulbificação *in vitro* utilizando a concentração de 50 g. L<sup>-1</sup> de sacarose, apresentou a melhor resposta para razão bulbar e massa fresca de bulbos.

Dentre as condições controladas no cultivo *in vitro*, é de extrema importância o controle do micromambiente, tanto para evitar contaminações, quanto para evitar problemas como hiperhidricidade, o aumento no aporte de carbono para um aumento na taxa de fotossíntese líquida dessas plantas cultivadas *in vitro*.

## 2.4 Efeito da troca gasosa no microambiente

O microambiente dentro dos frascos de cultura parece ser um ambiente homogêneo, e no entanto ele é o responsável por uma grande variabilidade no comportamento das culturas, uma vez que os fatores determinantes para a qualidade do microambiente são os tipos de frasco. Uma maneira de se alterar o microambiente dentro do frasco é a utilização de frascos com que permitem a troca gasosa, ou empregando-se tampas com a presença de membranas, dado que o tipo de vedação utilizado interfere diretamente nas trocas gasosas entre o microambiente *in vitro* com o ambiente *ex vitro*, acarretando assim no aumento das concentrações de dióxido de carbono e etileno no interior dos frascos se for utilizada (FILHO, 2002).

Um dos principais problemas que se tem na cultura de tecidos, é na fase de aclimação, onde são perdidas grande parte das plantas por elas não terem sistema radicular efetivo, aparato fotossintético eficaz e pouca pilosidade e cerosidade nas folhas, fazendo que percam água com facilidade para o meio externo, resultando na morte por desidratação. Quando uma planta é bem formada *in vitro* a mesma apresenta melhores condições de superar as adversidades que irá encontrar durante o processo de aclimação (BANDINELLI et al., 2013).

A regulação hídrica, na transição do metabolismo condicionada nas condições *in vitro* para as condições *ex vitro* é fundamental na etapa de aclimação. Quando se trata da atividade fotossintética das plantas *in vitro* a mesma é limitada principalmente devido a baixa intensidade luminosa a qual a planta é exposta, bem como a reduzida concentração de CO<sub>2</sub> no interior do recipiente de cultivo, além da presença de sacarose no meio de cultura que de maneira geral acaba sendo a única ou principal fonte de carbono para o crescimento e desenvolvimento dessas plantas *in vitro* (DECCETTI et al., 2008).

Deste modo, a transferência do ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro* requer alterações nas plantas micropropagadas, a fim de reduzir o estresse causado pelas diferenças entre as condições ambientais (SILVEIRA et al., 2013). Portanto são induzidas rustificações nessas plantas, processo que consiste basicamente na exposição gradual das plantas às condições externas ao ambiente de cultivo, e pode ocorrer *in vitro* e/ou durante o período de aclimação (BRITO-LIMA et al., 2016). Entre os procedimentos que induzem tais alterações *in vitro*, destacam-se o aumento na intensidade luminosa, a redução ou eliminação da sacarose do meio de cultura e aeração das culturas através de tampas com filtros.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia - UFU, campus Umuarama, localizado no município de Uberlândia – MG. Foram realizados dois ensaios, utilizando-se duas cultivares nobres de *Allium sativum* L: Quitéria e Ito, vernalizados á 4°C±1. A metodologia base que foi utilizada é descrita por TORRES e colaboradores (2000).

Para realização dos experimentos, foram utilizados meristemas com até dois primórdios foliares os quais foram excisados de bulbilhos, previamente desinfestados com solução de hipoclorito de sódio 1,5% (20 minutos), seguido de tríplice lavagem em água destilada esterilizada. Os meristemas foram extraídos e submetidos a duas fases de cultivo *in vitro*, a primeira para introdução do meristema em meio de cultura para o desenvolvimento inicial da planta (Fase de iniciação), e na segunda fase para o crescimento da planta, enraizamento e indução de bulbos (Fase de bulbificação).

Fase de iniciação - Para o crescimento inicial, os meristemas foram introduzidos em tubos de ensaio (15 mm x 100 mm) com 3 ml de meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado de vitaminas (Tiamina, Piridoxina, Glicina e Ácido Nicotínico), Mio-Inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (3%), e geleificado com ágar (0,6%). O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 1,5 atm por 15 minutos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 23 ± 2 °C, e fotoperíodo de 16h/luz e intensidade luminosa ajustada para 60 μmol de fótons m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> de lâmpadas LED brancas frias.

Fase de bulbificação – As plantas, em fase inicial de desenvolvimento foram transferidas individualmente para tubos de ensaio (20mm x 150mm) contendo 8 ml de meio MS, suplementado de vitaminas, Mio Inositol (100 mg L<sup>-1</sup>), sacarose (6%), e ácido naftalenoacético (0,2 mg L<sup>-1</sup>), e geleificado com ágar (0,6%). O pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo estabelecidas para a fase de regeneração, durante 180 dias.

Foram realizados dois experimentos na fase de Bulbificação, no experimento 1: utilizou-se modificações nas tampas, para avaliar a interferência do microambiente, quando se tem troca gasosa durante o desenvolvimento *in vitro* e no experimento 2: foram

utilizadas diferentes concentrações de sacarose no meio de cultivo para analisar o desempenho na fase de bulbificação das cultivares Ito e Quitéria.

### Experimento 1: Diferentes microambientes

Foram combinadas três tipos de tampas: sem furo, 1 furo e 2 furos, com as cultivares Ito e Quitéria, adotando-se delineamento experimental em blocos casualizados com esquema fatorial 2x3 com 6 tratamentos com 15 repetições

**Tabela 1:** Esquema experimental tipo de tampa X cultivar

Experimento			
TIPO DE TAMPA			
Cultivares	Sem furo	1 furo	2 furos
Ito	C <sub>1</sub> T <sub>1</sub>	C <sub>1</sub> T <sub>2</sub>	C <sub>1</sub> T <sub>3</sub>
Quitéria	C <sub>2</sub> T <sub>1</sub>	C <sub>2</sub> T <sub>2</sub>	C <sub>2</sub> T <sub>3</sub>

### Experimento 2: Concentrações de sacarose

Foram combinadas 6 concentrações de sacarose (0, 2, 4, 6, 8 e 10%) com as cultivares Ito e Quitéria adotando-se delineamento experimental em blocos casualizados com esquema fatorial 2x6 com 12 tratamentos com 5 repetições.

**Tabela 2:** Diferentes concentrações de sacarose X cultivar

Experimento						
[sacarose]						
Cultivares	[0%]	[2%]	[4%]	[6%]	[8%]	[10%]
Ito	C <sub>1</sub> T <sub>1</sub>	C <sub>1</sub> T <sub>2</sub>	C <sub>1</sub> T <sub>3</sub>	C <sub>1</sub> T <sub>4</sub>	C <sub>1</sub> T <sub>5</sub>	C <sub>1</sub> T <sub>6</sub>
Quitéria	C <sub>2</sub> T <sub>1</sub>	C <sub>2</sub> T <sub>2</sub>	C <sub>2</sub> T <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> T <sub>4</sub>	C <sub>2</sub> T <sub>5</sub>	C <sub>2</sub> T <sub>6</sub>

Cada parcela experimental foi composta por um pote plástico contendo 6 explantes. As características analisadas foram: Massa fresca de parte aérea (MFPA), Massa fresca de Raiz (MFR), Massa fresca de Bulbo (MFB), Número de bulbos por planta (NBP) e Diâmetro de bulbo (DB).

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de F a 5% de significância, após o atendimento das pressuposições de homogeneidade de variâncias (Levene), normalidade dos resíduos (Shapiro Wilk), e aditividade de blocos (F- Tukey). Se significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, Além disso, foi realizado o teste de

correlação de Pearson para as variáveis. Para o tratamento dos dados foi utilizado o programa estatístico R.

Para os tratamentos que mesmo após a transformação não atenderam as pressuposições, realizou-se o ranqueamento do mesmo e em seguida a análise não paramétrica com teste de média de Friedman. (R Core Team, 2021)

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### Experimento 1: Microambiente

A partir do resumo da análise de variância disposta na tabela 3, observa-se que houve interação significativa entre os fatores tipos de tampas e cultivares somente para a variável diâmetro de bulbos (DB), em contra partida, para as demais variáveis analisadas nota-se que a interação não foi significativa, o que caracteriza independência dos fatores estudados.

**TABELA 3:** Resumo da análise de variância avaliando das características: Massa fresca de parte aérea (MFPA), Massa fresca de raiz (MFR), Massa fresca de Bulbo (MFB), Número de bulbos por planta (NBP) e Diâmetro de bulbo (DB) das plântulas *in vitro* de alho (*Allium sativum*) em microambiente com um, dois e sem furos na tampado frasco. Uberlândia-MG, 2020.

Fonte de Variação	N de bulbos por planta	Diâmetro Bulbos	p-valor		
			MFR	MFPA	MF Bulbilho
Bloco	0.51952	0.29185	0.6894	0.4981	0.3269
Tipo de tampa	0.28823	0.0067	0.0156*	0.1322	0.1104
Cultivar	<0,001*	0.253088	<0,001*	<0,001*	0.0017*
Tipo de tampa*Cultivar	0.05998	0.02675*	0.1195	0.235	0.0819
CV (%)	16.7	5.57	14.39	12.62	13.39

\*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

**TABELA 4:** Teste de Média para as variáveis Número de Bulbo por Planta (NBP), Massa Fresca de Raiz (MFR), Massa Fresca de Parte Aérea (MFPA), Massa Fresca de Bulbo (MFB) em função das cultivares Ito e Quitéria, Uberlândia -MG 2020.

Cultivar	NBP	MFR (g)	MFPA (g)	MFB(g)
Ito	2,005 a	0,8694 b	0,5588 b	0,5961 a
Quitéria	1,130556 b	1,3305 a	0,7005 a	0,5094 b

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não se diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

Ao analisar a tabela 4, é perceptível que a cultivar Ito apresenta maiores valores médios para as características NBP (2,005) e MFB (0,5961) que são características produtivas desejáveis, e a cultivar Quitéria expressou maiores valores médios para as demais variáveis analisadas MFR (1,3305), MFPA (0,7005), que são características vegetativas.

O teste de média do efeito isolado do tipo de microambiente, para as características analisadas, podem ser analisados na tabela 5.

**TABELA 5:** Teste de Média para as variáveis Número de Bulbo por Planta (NBP), Massa Fresca de Raíz (MFR), Massa Fresca de Parte Aérea (MFPA), Massa Fresca de Bulbo (MFB) e Massa Fresca Total (MFT) em função do microambiente com um, dois e sem furos na tampa do frasco

Tipo de tampa	NBP	MFR (g)	MFPA (g)	MFB (g)
1 furo	1,4900 a	1,18 a	0,6591 a	0,53 a
Sem furo	1,5525 a	1,1341 ab	0,6375 a	0,5375 a
2 furos	1,6608 a	0,9858 b	0,5925 a	0,5908 a

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não se diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

Esse efeito isolado apresentou diferença significativa para a variável MFR, uma vez que a mesma se diferenciou estatisticamente apresentando maiores valores médios quando as plântulas de *A. Sativum* foram cultivadas em microambiente com tampas contendo um furo (1,18), e menores valores médios em microambiente com tampas contendo dois furos (0,9858) e as tampas sem furo apresentou um comportamento intermediário (1,1341). As demais variáveis analisadas apresentaram valores médios estatisticamente iguais, independente do tratamento utilizado.

**TABELA 6:** Teste de Média para a variável Diâmetro de Bulbos (DB) em função do microambiente com um, dois e sem furos na tampa do frasco e cultivares Ito e Quitéria. Uberlândia-MG, 2020

Tipo de tampa	Cultivar	
	Ito	Quitéria
Sem furo	2,1416 Aa	2,1883 Ba
1 furo	2,2966 Aa	2,1983 Ba
2 furos	2,2450 Ab	2,4433 Aa

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não se diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5 % de significância.

Nota-se que somente a cultivar Quitéria sofreu com o efeito do ambiente para a característica DB, em que exibiu maiores valores médios quando cultivada em ambientes com tampas contendo dois furos (2,4433). Ao observar a tabela também é possível inferir que a cultivar Ito quando cultivada em microambiente com tampas contendo dois furos apresentou valores médios de DB (2,2450), estatisticamente menores que a cultivar Quitéria (2,4433) para o mesmo tratamento.

A baixa concentração de CO<sub>2</sub> no interior dos recipientes de cultivo *in vitro* é a principal causa da oscilação da fotossíntese líquida de plantas cultivadas *in vitro* (Kozai, 1991). Uma forma para fornecer a entrada de CO<sub>2</sub> no interior dos frascos de cultivo é a aplicação de tampas e, ou frascos que possam permitir trocas gasosas (Erig e Schuch, 2005).

O emprego de membranas permeáveis a gases se mostrou até o presente momento uma alternativa que pode melhorar as condições ambientais *in vitro*, proporcionando aumento nas trocas gasosas do ambiente com o interior dos frascos, além disso espera-se que essa alternativa minimize estresses durante o processo da transferência das condições *in vitro* para a *ex vitro*, possibilitando assim maior sobrevivência na etapa de aclimatização. Uma vez que o estresse hídrico, causado pela saída da planta da condição *in vitro* para *ex vitro*, pode resultar em desequilíbrio, reduzindo o potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) e o potencial de pressão ( $\Psi_p$ ) levando a perda da turgescência das células (Taiz e Zeiger, 2013).

Permitindo as trocas gasosas, o CO<sub>2</sub> entra frequentemente no frasco, ocasionando uma redução significativa nas concentrações de etileno e da umidade relativa no interior dos frascos de cultivo (Kozai e Nguyen, 2003). Fato que explicaria o motivo das plântulas cultivadas durante o presente estudo em microambiente com tampas contendo dois furos atingirem maturação em média aos 90 dias, e com tampas de um furo em média 110 dias, e as cultivadas sem troca gasosa acima de 140 dias.

## **Experimento 2: Concentrações de sacarose**

Observou-se na Tabela 7 que as variáveis número de bulbos por planta, massa fresca de raiz e massa fresca da parte aérea apresentaram interação entre os fatores. Já a variável diâmetro de bulbilhos teve o fator isolado sacarose e isolado cultivar

significativos, enquanto que para a variável massa fresca de bulbilho somente o fator sacarose foi significativo.

**Tabela 7.** Resumo da análise de variância e não paramétrica (rank) avaliando das características das plântulas *in vitro* de alho (*Allium sativum*) em função e diferentes concentrações de sacarose para as cultivares Ito e Quitéria. Uberlândia-MG, 2020. Massa fresca de parte aérea (MFPA), Massa fresca de raiz (MFR), Massa fresca de Bulbo (MFB), Número de bulbos por planta (NBP) e Diâmetro de bulbo (DB).

Fonte de Variação	p-valor				
	NBP	DB	Rank (MFR)	MFPA	Rank (MFB)
Bloco	0,6204	0,4309	0,7724	0,2616	0,6521
Sacarose	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Cultivar	<0,001	0,0483	<0,001	<0,001	0,9582
Sacarose*Cultivar	<0,001	0,5642	<0,001	<0,001	0,1041
CV (%)	35,27	16,75	30,2	25,75	32,14

\*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F

Na Tabela 8 é possível verificar que a cultivar Quitéria tem maiores valores médio de diâmetro de bulbos (4,5363) comparado com a cultivar Ito (4,1546). Esse resultado provavelmente se deve ao fato de que a cultivar Quitéria sempre chega ao fim de seu ciclo com algumas folhas ainda verdes, enquanto que a cultivar Ito aos 150 dias praticamente todas suas folhas já senesceram. Esta situação apresenta-se como um indicativo de que a planta encontra-se na fase final do crescimento vegetativo, sendo acompanhada, além da gradual senescência foliar, pela paralisação do crescimento da planta em altura e intensificação do crescimento dos bulbos (Mann, 1952). Deste modo esse maior diâmetro de bulbo pode ser atribuído a esse maior ciclo da cultivar Quitéria quando cultivada *in vitro* por volta de até 30 dias a mais que Ito.

**Tabela 8.** Teste de média para a variável Diâmetro de Bulbos (DB) em função das cultivares Ito e Quitéria. Uberlândia-MG, 2020.

Cultivar	Variáveis
	DB
Ito	4,1546 b
Quitéria	4,5363 a

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não se diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de significância.

**Tabela 9.** Teste de média para as variáveis DB e MFB em função de diferentes concentrações de sacarose. Uberlândia- MG, 2020.

Sacarose	Variáveis	
	DB (mm)	MFB(g)
0%	0 c	5,591(0,00) c
2%	4,381 b	18,382 (0,1062) c
4%	5,125 b	36,980 (0,3312) ab
6%	5,221 ab	32,452 (0,2336) b
8%	5,566 a	45,803 (0,4836) a
10%	5,471 a	44,957 (0,3295) ab

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não se diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5 % de significância.

É perceptível nos dados expostos na tabela 9, que para concentrações de sacarose acima de 6% independente da cultivar, os bulbos aumentaram significativamente de tamanho, a concentração 8% (5,566), no entanto o mesmo não se diferiu estatisticamente do tratamento onde se utilizou a concentração 10% (5,47). A massa fresca dos bulbos apresentou um comportamento semelhante no entanto a concentração 8% (0,4836), se mostrou estatisticamente igual aos tratamentos 4%(0,3312) e 10 % (0,3295). O aumento adicional no tamanho e peso do bulbo é desejável do ponto de vista prático na micropropagação, pois a produção de bulbos maiores evita perdas, muito comuns durante a aclimatização de plantas.

Na tabela 10, a interação número de bulbos por planta, tanto pra a cultivar Ito, quanto Quitéria, os maiores valores médios foram obtidos nos tratamentos de 8% (3,526); (1,76) e 10% (3,412); (2,148). Ainda fica evidente também a superioridade da cultivar Ito em relação a cultivar Quitéria, para essa característica.

**Tabela 10.** Teste de média da interação dos fatores diferentes concentrações de sacarose e cultivar. Uberlândia- MG, 2020.

Variáveis	Sacarose	Cultivar	
		Ito	Quit
Nº de Bulbos planta	0%	0cA	0bA
	2%	0,3581cA	0,1764bA
	4%	2,4120bA	0,4751bB
	6%	3,0689abA	0,6780bB
	8%	3,5260aA	1,7640aB
	10%	3,4122aA	2,1481aB
Rank (MFR) (g)	0%	4,4 (0,0978) bA	9,4 (0,1404) dA
	2%	31,8 (0,7069) aA	30,4 (0,6712) cA
	4%	29,5 (0,6744) aB	52,8 (1,3704) abA
	6%	27,4 (0,6077) aB	55,4 (1,5413) aA
	8%	21,8 (0,4340) aB	37,9 (0,8227) bcA
	10%	18 (0,0978) abB	47,2 (1,1248) abcA
MFPA (g)	0%	0,1315cA	0,1448bA
	2%	0,6738aA	0,6817aA
	4%	0,3631bB	0,6623aA
	6%	0,2886bcB	0,5811aA
	8%	0,1358cB	0,5195aA
	10%	0,1466cB	0,6108aA
Taxa de bulbificação (%)	0%	0	0
	2%	40	22
	4%	98	40
	6%	98	79
	8%	100	85
	10%	100	80

Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não se diferem pelo teste Tukey a 5% de significância.

Ainda analisando a tabela, nota-se que a variável massa fresca de raiz, para cultivar Ito atingiu valores máximos a partir de 2%, não se diferindo estatisticamente das demais concentrações acima de sacarose, até o limite de 10 %. A cultivar Quitéria apresentou comportamento semelhante, mas o que chama a atenção é o fato que a cultivar Ito mostrou valores inferiores de massa fresca de raiz em praticamente todos os tratamentos. A variável massa fresca de parte aérea também exibiu padrão de resultados semelhantes ao de massa fresca de raiz.

Esses resultados estão em conformidade com os descritos por Vieira (2012), onde as variáveis número de bulbos por planta, porcentagem de bulbificação e diâmetro e massa fresca de bulbo responderam positivamente ao aumento da concentração de

sacarose no meio de cultura até o nível de 9%. Kim et al. (2003) obtiveram sucesso na indução da bulbificação *in vitro*, utilizando como estresse hídrico o aumento do potencial osmótico do meio de cultura adicionando concentrações de sacarose (50 a 110 g L<sup>-1</sup>). No trabalho realizado por Longo et al (2012) a micropropagação e bulbificação *in vitro* utilizando a concentração de 50 g. L<sup>-1</sup> de sacarose, apresentou a melhor resposta para razão bulbar e massa fresca de bulbos.

Vieira (2012) notou que em concentrações de carboidratos de 12% ocorre uma diminuição significativamente o tamanho e peso de bulbos. Isso pode ser explicado pelo fato de que a alta concentração de sacarose pode reduzir o potencial osmótico ( $\Psi_s$ ) do meio de cultura, fazendo com que o potencial hídrico ( $\Psi_w$ ) da planta reduza drasticamente, podendo chegar ao ponto de impedir o sucesso da transferência do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* (Kozai et al., 2005; Park et al., 2011; Taiz e Zeiger, 2013).

O excesso de sacarose adicionado ao meio de cultura, ainda pode trazer aumento no custo de produção do cultivo *in vitro*, não pelo preço de mercado, uma vez que sua aquisição necessita de um custo relativamente baixo, mas sim pela probabilidade do risco de contaminação *in vitro*. Dado que a sacarose no meio de cultura pode favorecer o crescimento de patógenos como fungos e bactérias, causando competição com a planta pelo meio de cultura, ocasionando a morte dos vegetais (Prakash et al., 2004).

Ainda de acordo com Vieira (2012), a elevação de níveis de carboidratos impactam na formação e no crescimento de órgãos de armazenamento. Ele traz as seguintes hipóteses correntes para tal fato, que são: (1) O aumento dos níveis de carboidratos proporcionalmente resultam no aumento e melhora de fornecimento de energia, a qual pode ser usada diretamente para a indução e crescimento, e (2) aumentar os níveis de carboidratos, conseqüentemente acarretará na elevação da osmolaridade do meio, resultando em um tipo de “stress” no ambiente, gerando como resposta, à indução desses órgãos de armazenamento. Staikidou et al. (2005) sugerem que o fornecimento de carboidratos pode ser mais importante do que a osmolaridade para a indução de bulbos.

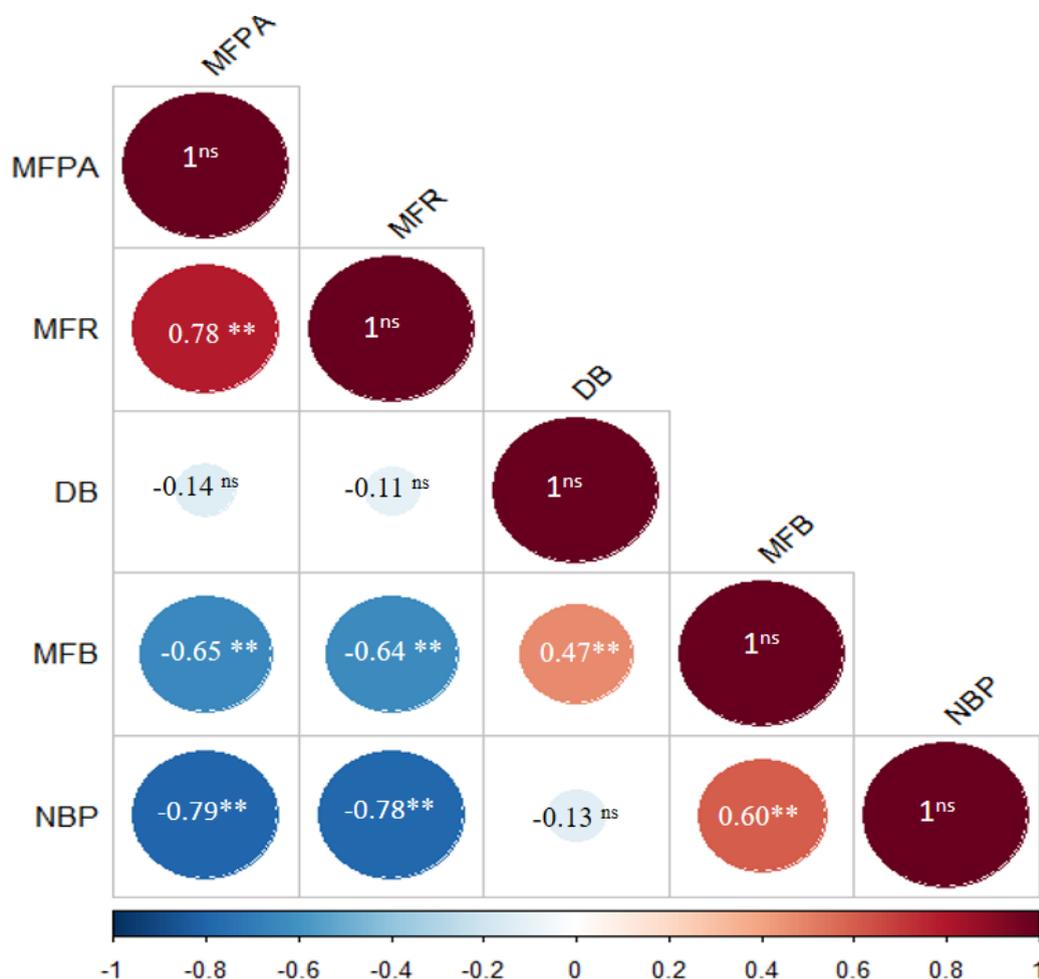
Com relação a porcentagem de bulbificação, a cultivar Ito se mostrou mais responsiva mesmo em menores concentrações de sacarose, que a cultivar Quitéria, essa resposta possivelmente está relacionada à outros fatores ligado ao meio de cultivo, dado que um comportamento semelhante foi observado no experimento de troca gasosa.

Neste trabalho a cultivar Quitéria sempre apresentou menores taxas de

bulbificação, o que indica a necessidade de alteração de outros fatores, os quais não foram estudados durante a realização deste trabalho, para que essa cultivar passe a apresentar maior taxa de bulbificação *in vitro*. A baixa taxa de bulbificação da cultivar Quitéria, possivelmente pode estar relacionada com o fornecimento de nitrogênio (N) na etapa de bulbificação, uma vez que, Sob condições de cultivo a campo, o pseudoperfilhamento ou superbrotamento, que é muito comum em alho da classe nobre, comumente está relacionado ao fornecimento de altas doses de N (MELO; OLIVEIRA, 1999; RESENDE; SOUZA, 2000; MAROUELLI et al., 200). Deste modo é indicado que mais estudos sejam realizados com a cultivar Quitéria e seu meio de cultivo

Durante a realização das avaliações dos experimentos, algo que chamou a atenção foi o fato de que sempre que variáveis vegetativas apresentavam valores elevados como massa fresca de parte aérea e massa fresca de raiz, as características de interesse agrônomo como número de bulbo por planta, diâmetro de bulbo e massa fresca de bulbo em contra partida apresentavam valores inversamente menores. Com o intuito de averiguar se essa relação inversamente proporcional era verídica, os dados foram submetidos a uma análise de correlação de Pearson, e o resultado está discriminado na figura 1.

**Figura 1:** Correlação de Pearson para Massa fresca de parte aérea (MFPA), Massa fresca de Raíz (MFR), Massa fresca de Bulbo (MFB), Número de bulbos por planta (NBP) e Diâmetro de bulbo (DB), para plântulas cultivadas *in vitro* de alho.



\*\*Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t, <sup>ns</sup> Não significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.

A classificação de intensidade da correlação é considerada fraca quando os valores de r se encontram entre 0,20 e 0,50, forte entre os valores de 0,50 e 0,70 e muito forte entre 0,70 e 1,0. Indicando que quanto mais próximo de 1 (independente do sinal) maior é o grau de dependência estatística linear entre as variáveis e quanto mais próximo de zero, menor é a força dessa relação.

Ao analisar a correlação de Pearson, observa-se que de fato existe correlação negativa forte entre plantas de alho para as características MFR e MFPA com NBP e MFB, e com base nas características analisadas infere-se que a cultivar Ito se mostrou superior para o cultivo *in vitro* em larga escala por reunir mais caracteres desejáveis do ponto de vista agrônômico. De modo que para pesquisas futuras sugere-se que sejam

realizados experimentos que busquem reduzir a proporção de matéria vegetativa de parte aérea e radicular e aumentem as características de interesse que estão direcionadas ao bulbo e para isso sugere-se um estudo de balanço hormonal, ou diferentes agentes osmóticos adicionados ao meio de cultivo por exemplo.

## 5. CONCLUSÃO

- 1) Existe correlação negativa forte entre plantas de alho para as características MFR e MFPA com NBP e MFB.
- 2) Com relação ao experimento de diferentes microambiente, o tratamento sem furo na tampa, não se diferiu estatisticamente para as características NBP e MFB dos demais tratamentos e ainda se mostrou o tratamento menos oneroso por não necessitar da realização de furos nas tampas, além de diminuir o risco de contaminação, o que é algo desejável para produção em larga escala.
- 3) Para o experimento de concentrações de sacarose, a concentração de 8% reuniu maiores rendimentos das características de interesse DB, NBP e MFB.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAPA- Associação Brasileira dos Produtores de Alho- Blog do alho, disponível em <<<https://anapa.com.br/com-intensa-concorrenca-do-importado-alho-brasileiro-teracao-de-marketing-no-varejo/>>> acesso out 2021.

BANDINELLI, M. G.; BISOGNIN, D. A.; GNOCATO, F. S.; MAMBRIN, R. B.; SAUSEN, D.; NICOLOSO, F. T. Concentração dos sais e da sacarose do meio MS na multiplicação *in vitro* e na aclimatização de batata. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 2, n. 31, p. 242-247, abr./jun. 2013. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362013000200011>

CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. 3. ed. Brasília: Embrapa, 2014. 325 p.

DE ANDRADE, S. R. M. Princípios da cultura de tecidos vegetais. **Embrapa Cerrados- Documentos (INFOTECA-E)**, 2002.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Photoautotrophic micropropagation and use of the natural light. **Ciência rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 961-965, jul./ago. 2005. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000400039>

FERNANDES, D. A.; AZEVEDO, P. H. de; COSTA, R. B. da; BRONDANI, G. E. Tipos de vedação e concentrações de sacarose no cultivo *in vitro* de *Tectona grandis* L.f. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 88, n. 3, p. 218-228, dez./mar. 2013. <https://doi.org/10.37856/bja.v88i3.114>

FILHO, W. B.; PEREIRA A. M. S.; FRANÇA, S. C.; FURLAN, M. **Indução de Metabólitos Bioativos em Culturas de Células de Maytenus Illicifolia**. Eclética Química. v.27 n. especial, São Paulo, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0100-46702002000200033>

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories**. Basingstoke: Exegetics, 1984. 709 p.

KOZAI, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. *In*: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, T. H. **Micropropagation technology and application**. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 1991. p. 447-469. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-2075-0\\_26](https://doi.org/10.1007/978-94-009-2075-0_26)

KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T. Photoautotrophic micropropagation of Wood and tropical plants. *In*: JAIN, S. M.; ISHII, K. **Micropropagation of wood trees and fruits**. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 757-781. [https://doi.org/10.1007/978-94-010-0125-0\\_26](https://doi.org/10.1007/978-94-010-0125-0_26)

KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED; S. M. A. **Photoautotrophic (sugar free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system**. Dordrecht: Springer, 2005. 315 p. <https://doi.org/10.1007/1-4020-3126-2>

LAMEIRA, O. A.; LEMOS, O. F.; MENEZES, I. C. de; PINTO, J. E. B. P. **Cultura de tecidos (manual)**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 41 p.

LONGO, A. E. D. O. E., SIQUEIRA, W. J., PASSOS, I. R. D. S., SCOTT, M. D. S., & DE AZEVEDO FILHO, J. A. (2012). **MICROPROPAGAÇÃO E BULBIFICAÇÃO IN VITRO DE ALHO (*Allium sativum* L.)**. *Plant Cell Culture & Micropropagation- ISSN 1808-9909*, 8(1-2), 18-26

MANN, L. K. Anatomy of the garlic bulb and factors affecting bulb development. **Hilgardia**, Berkeley, v. 21, n. 8, p. 195-249, 1952. <https://doi.org/10.3733/hilg.v21n08p195>

MENEZES JÚNIOR, F. O. G de. Cultivo *in vitro* do alho visando a limpeza clonal. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 10, n. 2, p. 158-167, jul./dez. 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Rockville, v. 15, p. 473-497, 1962. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

PARK, S. Y.; MOON, H. K.; MURTHY, H. N.; KIM, Y. W. Improved growth and acclimatization of somatic embryo-derived *Oplopanax elatus* plantlets by ventilated photoautotrophic culture. **Biologia Plantarum**, República Tcheca, v. 55, n. 3, p. 559-562, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10535-011-0125-4>

PINHEIRO, M. V. M.; MARTINS, F. B.; XAVIER, A.; OTONI, W. C. Trocas gasosas influenciam na morfogênese *in vitro* de cultivares de oliveira (*Olea europaea* L.). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 37, n. 1, p. 19-29, jan./fev. 2013. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622013000100003>

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Viena: R Foundation for Statistical Computing, 2021. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. Acesso em: 20 out. 2021.

RESENDE, F. V.; MARODIN, J. C.; SOUZA, R. J. Desempenho agrônômico do alho infectado e livre de vírus em função do tamanho de bulbos bulbilhos utilizados para o plantio. **Embrapa Hortaliças-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2018.

RUBIN, C. [Revista indicadores a Agroecúaria] Alho – Altos Preços, mas Clima Preocupa a Próxima Safra no Sul disponível em:

<<[file:///C:/Users/User/Downloads/MercadoZdeZZAlhoZnoZSulZdoZPais%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/User/Downloads/MercadoZdeZZAlhoZnoZSulZdoZPais%20(2).pdf)>>

acesso em dez 2021.

STAIKIDOU, I.; WATSON, S.; HARVEY, B. M. R.; SELBY, C. *Narcissus* bulblet formation in vitro: effects of carbohydrate type and osmolarity of the culture medium. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Basingstoke, v. 80, p. 313-320, 2005. <https://doi.org/10.1007/s11240-004-1366-0>

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 820 p.

TORRES, A. C.; FAJARDO, T. V.; DUSI, A. N.; RESENDE, R. de O.; BUSO, J. A. Shoot tip culture and thermotherapy for recovering virus-free plants of garlic. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 3, p. 192-195, jul./set. 2000. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362000000300010>

WOJTANIA, A.; WĘGRZYNOWICZ-LESIAK, E. Ethylene and cytokinin interaction in the morphogenesis of *Pelargonium × hortorum* L.H. Bailey *in vitro*. **Acta Physiologiae Plantarum**, Poznan, v. 34, n. 6, p. 2407-2412, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1005-z>

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Basingstoke, v. 105, p. 149-158, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9863-9>