



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ANDRÉIA PEREIRA DOS SANTOS

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO *IN VITRO* DE
MICROBULBOS DE *Allium sativum* DAS CULTIVARES LIVRE DE VIRUS ITO E
QUITÉRIA

UBERLÂNDIA - MG

2022

ANDRÉIA PEREIRA DOS SANTOS

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA OBTENÇÃO *IN VITRO* DE
MICROBULBOS DE *Allium sativum* DAS CULTIVARES ITO E QUITÉRIA LIVRE
DE VIRUS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia como parte das exigências do Programa de
Pós-graduação em Agronomia – Mestrado.

Área de concentração: Produção Vegetal

Orientador: Prof. Dr. José Magno Queiroz Luz

UBERLÂNDIA - MG

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- S237o
2022 Santos, Andréia Pereira dos, 1992-
Otimização de protocolo para obtenção *In vitro de microbulbos de allium sativum* das cultivares Ito e Quitéria livre de vírus [recurso eletrônico] / Andréia Pereira dos Santos. - 2022.
- Orientador: José Magno Queiroz Luz.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Agronomia.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.5360>
Inclui bibliografia.
Inclui ilustrações.
- I. Agronomia. I. Luz, José Magno Queiroz, 1967-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU: 631

Glória Aparecida
Bibliotecária - CRB-6/2047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia
 Rodovia BR 050, Km 78, Bloco 1CCG, Sala 206 - Bairro Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 2512-6715/6716 - www.ppga.iciag.ufu.br - posagro@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Agronomia				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 013/2022, PPGAGRO				
Data:	Primeiro de agosto de dois mil e vinte e dois	Hora de início:	08:30	Hora de encerramento:	11:30
Matrícula do Discente:	12012AGR003				
Nome do Discente:	Andréia Pereira dos Santos				
Título do Trabalho:	Otimização de protocolo para obtenção in vitro de microbulbos de Allium sativum das cultivares Ito e Quitéria livre de vírus				
Área de concentração:	Produção Vegetal				
Linha de pesquisa:	Produção Vegetal em Áreas de Cerrado				

Reuniu-se por videoconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Agronomia, assim composta: Professores Doutores: Ana Paula Oliveira Nogueira - UFU; Rayssa Camargo de Oliveira - ; Muza do Carmo Vieira - UFG; José Magno Queiroz Luz - UFU orientador da candidata.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Dr. José Magno Queiroz Luz, apresentou a Comissão Examinadora e o candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu a Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação da Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, às examinadoras, que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando a candidata:

Aprovada.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **José Magno Queiroz Luz, Professor(a) do Magistério Superior**, em 01/08/2022, às 11:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Oliveira Nogueira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 01/08/2022, às 11:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Muza do Carmo Vieira, Usuário Externo**, em 02/08/2022, às 10:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rayssa Camargo de Oliveira, Usuário Externo**, em 02/08/2022, às 13:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3790532** e o código CRC **A5BE54EA**.

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 inúmeros 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, apoio e ensinamentos transmitidos na realização desta pesquisa;

A 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, 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.

Aos demais familiares e amigos, agradeço.

RESUMO

Objetivou-se otimizar o protocolo para obtenção *in vitro* de alho livre de vírus, desenvolvido para as cultivares de alho Caçador e Amarante, descrito por Torres e colaboradores (2001), para as cultivares de alho nobre Ito e Quitéria. Avaliando o efeito da luminosidade, dos microambientes, das concentrações de sacarose, além das temperaturas de vernalização e o tempo de termoterapia com o intuito de se obter menor taxa de hiperhidricidade e maior produtividade das cultivares Ito e Quitéria via cultura de meristemas. Foram realizados quatro experimentos em delineamento inteiramente casualizados. No primeiro, foram testados três tipos de lâmpadas: LEDs azuis, vermelhos e brancos. No segundo, verificou-se o impacto de três tipos de microambientes utilizando tampas sem filtros, com um filtro e tampas contendo dois filtros. No terceiro, analisou-se as concentrações de sacarose: 0, 2, 4, 6, 8 e 10%. No quarto experimento, avaliou-se temperaturas de vernalização combinadas com diferentes dias de termoterapia a 37°C: 2 faixas de temperaturas de -1 a -3°C (vernalização em temperatura negativa) e de 2 a 4°C (vernalização em temperatura positiva), e quatro períodos de termoterapia: 0, 10, 20 e 30 dias. Pode-se citar alguns dos resultados alcançados, como o fato de os LEDs azuis proporcionarem resultados superiores para todas os parâmetros avaliados, com exceção da característica diâmetro de bulbo (DB). O microambiente com tampas contendo um filtro promoveu menor taxa de hiperhidricidade, em ambas cultivares. A sacarose proporcionou incremento crescente na produtividade dos órgãos de reservas. Quanto menor a quantidade de dias de termoterapia, maiores foram os resultados acerca da produtividade média dos microbulbos, com destaque para temperatura de vernalização negativa em comparação com a temperatura positiva para ambas cultivares. Entretanto, é necessário um tempo mínimo de termoterapia de 20 dias para que bulbilhos vernalizados à temperatura negativa produzam *in vitro* com adequada redução do “pool” de viroses. No que tange a qualidade dos materiais doadores de meristema, conforme se passaram os dias em que os bulbilhos foram submetidos à termoterapia, o percentual de materiais que permaneceram viáveis diminuíram, principalmente, para os bulbilhos que foram vernalizados em temperaturas positivas.

Palavras-chave: LEDs; microambiente; sacarose; vernalização; termoterapia.

ABSTRACT

The objective of this study was to optimize the protocol for obtaining virus-free garlic *in vitro* developed for the garlic cultivars Caçador and Amarante, described by Torres et al. (2001), for the noble garlic cultivars Ito and Quitéria. Evaluating the effect of luminosity, microenvironments, sucrose concentrations, vernalization temperatures and thermotherapy time in order to obtain a lower rate of hyperhidricity and higher productivity of the cultivars Ito and Quitéria via meristem culture. Four experiments were conducted in an entirely randomized design. In the first experiment, three types of lamps were tested: blue, red and white LEDs. In the second, the impact of three types of microenvironments was verified: lids without a filter, lids with a filter, and lids containing two filters. In the third experiment, five concentrations of sucrose were analyzed: 0, 2, 4, 6, 8, and 10%. In the fourth experiment, the effect of the vernalization temperatures combined with different days of thermotherapy at 37°C were evaluated. Two temperature ranges: -1 to -3°C (vernalization at negative temperature) and 2 to 4°C (vernalization at positive temperature), and four periods of thermotherapy: 0, 10, 20 and 30 days were used. The results showed that the blue LEDs provided superior results for all parameters evaluated, except for the characteristic bulb diameter (DB). In addition, the microenvironment with caps containing a filter promoted a lower rate of hyperhidricity in both cultivars. Sucrose provided increased productivity of the reserve organs. The lower the number of days of thermotherapy, the higher the average productivity of microbulbs, especially with the negative vernalization temperature when compared to the positive temperature for both cultivars. However, a minimum therapy time of 20 days is necessary for bulbs vernalized at a negative temperature to produce *in vitro* with adequate reduction of the virus pool. Regarding the quality of meristem donor materials, as the days in which the bulbs are submitted to thermotherapy went by, the percentage of viable materials decreases, especially for bulbs that were vernalized at positive temperatures.

Keywords: LEDs, microenvironment, sucrose, vernalization, thermotherapy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 O ALHO	12
2.2 CULTIVARES DE ALHO NOBRE.....	13
2.2.1 Cultivar Ito.....	13
2.2.2 Cultivar Quitéria.....	13
2.3 COMPLEXO VIRAL DO ALHO.....	14
2.5 CULTURA DE MERISTEMAS PARA LIMPEZA VIRAL	15
2.5.1 Efeito da concentração de sacarose no cultivo <i>in vitro</i>	16
2.5.2 Influência da troca gasosa no microambiente	18
2.5.3 Importância da qualidade luminosa no cultivo <i>in vitro</i>	Erro! Indicador não definido.
2.5.4 Hiperhidricidade	21
2. 6 ETAPAS PARA A PRODUÇÃO DE BULBOS.....	22
2.6.1 Vernalização	Erro! Indicador não definido.
2.6.2 Termoterapia na cultura do alho	23
2.6.3 Multiplicação de alho-semente em ambiente protegido	24
3. MATERIAL E METODOS	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
5. CONCLUSÃO.....	45
6. REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

O alho (*Allium sativum* L.) é uma das hortícolas mais consumidas em todo o mundo, tanto pelo sabor quanto pelo potencial nutritivo e medicinal. Entretanto, devido a suas características agrônômicas de cultivo, o alho é uma cultura que demanda elevado conhecimento técnico sobre seu manejo, principalmente, quando cultivado fora de seu centro de origem - a Ásia central, como ocorre no Brasil. O panorama atual do mercado nacional consumidor de alho apresenta que a produção interna aumentou expressivamente ao longo dos últimos anos e tende a continuar. No entanto, dados recentes mostram que, no ano de 2020, por exemplo, cerca de 55% de todo o alho consumido no Brasil foi produto de importação, especificamente, de origem chinesa e argentina. Tal situação evidencia que a produção nacional ainda não consegue suprir a demanda interna (ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES DE ALHO -ANAPA, 2022).

Por conseguinte, esse alto volume de importações tem como consequência direta um impacto negativo nos preços internos do produto, deixando o produtor brasileiro em desvantagem com essa competição entre preço e qualidade, uma vez que o alho nobre brasileiro é superior em qualidade quando comparado aos que são importados, mas em contrapartida seu custo de produção é proporcionalmente mais elevado. A fim de tornar seu produto mais competitivo, os produtores brasileiros têm alternativas limitadas, sendo que uma delas é apostar no aumento da qualidade do produto oferecido ao consumidor. Contudo, um dos fatores limitantes para alcançar esse objetivo são os complexos virais que se acumulam no alho produzido no campo, uma vez que ocasionam a diminuição da produtividade e a qualidade do produto geração após geração (RESENDE, 2018; ANAPA, 2022).

Por ser uma espécie de propagação vegetativa, o alho tem a disseminação dessas doenças virais facilitadas, logo uma das técnicas mais utilizadas para tentar conter o avanço desses complexos virais no campo é a micropropagação, mais precisamente a cultura de meristema. Esse processo permite quebrar o ciclo de replicação dos vírus e resgatar as plantas da degenerescência viral, com uma taxa de eficiência média de 80 a 95% de plantas livres de vírus (LV), além de oferecer um grande potencial para multiplicação rápida e massal em período de tempo e espaço físicos reduzidos, resultando na obtenção de plantas com elevado grau fitossanitário. Todavia, 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).

Para o sucesso da técnica, é de suma importância não somente o domínio da técnica, mas também o ajuste específico para cada espécie que se deseja trabalhar, já que esses fatores impactam diretamente no estabelecimento dessas plantas cultivadas *in vitro*. Fatores, como a composição dos meios de cultura de tecidos, balanço hormonal, concentração de sacarose, utilização de agentes osmóticos, permeabilidade e trocas gasosas no microambiente, além do fotoperíodo e temperatura adequados, devem estar harmonicamente bem estabelecidos e controlados, pois se somam com o fito de uma melhor micropropagação (ANDRADE, 2002).

Cabe ressaltar que um ponto limitante existente na produção de alho via cultura de meristemas, é a alta taxa de microbulbos com hiperhidricidade, a qual pode comprometer a etapa de *ex vitro* (aclimatização), devido à baixa taxa de brotação e sobrevivência dos microbulbos que apresentam essa anomalia (SANTOS, 2021).

A hiperhidricidade é um desarranjo no qual as plantas apresentam desordens morfológicas e fisiológicas decorrentes do elevado teor de água no interior das células e tecidos, podendo atingir 60% dos brotos micropropagados (ZIV, 1991; FONTES, 1998; PARK et al., 2004). Outros entraves na cultura de meristemas de plantas de alho são a diminuta quantidade de protocolos existentes na literatura, bem como as especificidades das variedades existentes para se trabalhar, sendo assim existe a necessidade de se aprimorar os protocolos já existentes para pleno desenvolvimento das plantas até a bulbificação *in vitro*. Esse procedimento possui o intuito claro de otimizar o processo e aumentar a produção *in vitro*, além de diminuir perdas durante a aclimatização das plantas (KIM et al., 2003).

A partir da discussão realizada, objetivou-se com o presente estudo realizar a otimização e o ajuste do protocolo desenvolvido por Torres et al. (2001), para obtenção de microbulbos das cultivares Ito e Quitéria, avaliando o efeito da luminosidade, microambientes, concentrações de sacarose, temperaturas de vernalização e o tempo de termoterapia, visando atingir maior produtividade e menor taxa de hiperhidricidade dessas cultivares via cultura de meristemas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O ALHO

O alho (*Allium sativum* L.) é uma planta originária da Ásia, onde há locais de clima frio e estações bem definidas, o que é muito importante para um bom desenvolvimento vegetativo e produtividade da cultura, que exige temperaturas amenas (18° a 20°C) na fase inicial do ciclo, temperaturas mais baixas (10° a 15°C) durante o período de bulbificação e temperaturas mais elevadas (20° a 25°C) na fase de maturação (FILGUEIRA, 2008).

O fotoperíodo é determinante para a formação do bulbo, assim algumas cultivares necessitam de dias mais longos para bulbificação, sendo consideradas tardias, enquanto as precoces respondem ao estímulo de dias mais curtos. Em condições de fotoperíodo insuficiente ocorre apenas o crescimento vegetativo, sem formação de bulbos (RESENDE et al., 2018).

O alho é uma planta herbácea, família Alliaceae. Possui folhas lanceoladas, estreitas e cerosas. Pode atingir até 60 cm de altura, conforme a cultivar. As bainhas das folhas se desenrolam em pseudocaulo curto, em que na parte inferior origina-se o bulbo. O caule verdadeiro é um disco comprimido sendo o ponto de partida das folhas e das raízes, com poucas ramificações. A profundidade varia de 20 a 30 cm (RESENDE, 2018).

O bulbo, de formato redondo ou ovalado, é dividido em bulbilhos, vulgarmente denominado de dentes que podem variar em número de 5 a 56. Os bulbilhos são compridos, ovoides e de forma arqueada, envoltos por folhas protetoras chamadas brácteas. A coloração pode ser branca, vermelha, violeta, roxa e marrom. Além dessa proteção individual, o bulbo ainda é envolto por várias túnicas esbranquiçadas que são facilmente destacáveis (RESENDE et al., 2018).

A propagação do alho ocorre exclusivamente por estruturas vegetativas denominadas bulbilhos, isto é, plantios sucessivos de bulbilhos ao longo dos ciclos. O alho está entre as primeiras plantas consumido pelo homem para fins culinários ou medicinais (FILGUEIRA, 2008).

No Brasil, a produção em 2020 foi de 155.700 toneladas, numa área colhida de 12.223 hectares e rendimento médio de 12.738 Kg por hectare com o maior produtor sendo o estado de Minas Gerais. A produção nacional de alho em 2020 teve um aumento de 18,9% na comparação com o ano anterior. Entre 2016 e 2020, a produção aumentou a

uma taxa média anual de 4,1%, refletindo o aumento de área de 1,7% ao ano e o aumento de produtividade de 2,4% no referido período (CONAB, 2021; IBGE, 2022).

O consumo aumentou de 30 milhões de caixas de 10 kg em 2019 para 36 milhões em 2020. No entanto, a produção brasileira de alho não é suficiente para atender a demanda interna, com constantes importações de países como Argentina, China e Espanha. O alho importado chega ao Brasil com preços muito competitivos, dessa maneira, com base em regras de proteção comercial estabelecidas pela Organização Mundial do Comércio (OMC), tem sido cobrada pelo Brasil uma tarifa antidumping para evitar a concorrência desleal do produto importado (ANAPA, 2022; RESENDE, 2018).

O Brasil pode suprir apenas parte da sua demanda interna de consumo de alho, no entanto a autossuficiência é possível pois existe potencial de expansão da cultura para as mais diversas regiões do país. Além das regiões produtoras tradicionais do Sul, sudeste e Centro-Oeste, áreas de microclimas de altitude da região Nordeste e, até mesmo do Norte do país, podem ser utilizadas para exploração comercial da cultura (RESENDE, 2018). Porém, são regiões com características edafoclimáticas bastante distintas entre si, sendo necessários estudos específicos para cada situação, visando obter maior eficiência produtiva e sustentabilidade. Nesse sentido, pesquisas envolvendo a adaptação de cultivares, nutrição mineral, manejo da irrigação, vernalização, qualidade de alho-semente e conservação pós-colheita são indispensáveis (RESENDE, 2018).

Segundo pesquisas, as cultivares de alho apresentam comportamento diferenciado em função das variadas condições climáticas. Nesse sentido os materiais com diferentes denominações locais, podem originar muitas cultivares de alho. A caracterização das cultivares, conforme características comuns a cada grupo tem sua relevância na indicação de cultivares mais adaptadas às diferentes regiões (FILGUEIRA, 2008; RESENDE, 2018).

2.2 CULTIVARES DE ALHO NOBRE

As cultivares do grupo nobre são caracterizadas por possuírem bulbos redondos e uniformes, bulbilhos grandes com ausência de palitos e sensibilidade ao superbrotamento. Os bulbos têm túnica de cor rósea ou roxa e os bulbilhos têm película rósea escura, necessitando de vernalização para plantio nas regiões do Cerrado Brasileiro (MOTA et al., 2004, 2006). As mais cultivadas no Brasil e com melhores características agrônômicas e comerciais são: Ito, Caçador, Quitéria, Jonas e Chonan, porém entre as cultivares têm

aquelas que melhor se adequam para cada região e época de cultivo. Como no caso das cultivares Ito e Quitéria na região do Cerrado (RESENDE, 2003).

Possui ciclo tardio de 6 ou mais meses, cor da casca roxa e ciclo enquadrado como tardio (6 meses ou mais, quando cultivado sobre condições naturais). Quanto às características do bulbo, apresenta de 7 a 10 bulbilhos. O bulbo é de formato redondo e tipo palito; possui alta exigência em fotoperíodo, bem como de temperaturas amenas para indução da bulbificação. Essa cultivar é suscetível ao perfilhamento, produz bulbilhos graúdos e de alta qualidade comercial, dessa forma possui condições de competir no mercado consumidor com o alho importado (RESENDE et al., 2017).

Cultivar Quitéria

Possui ciclo tardio de 6 ou mais meses, cor da película roxa e ciclo tardio (6 meses ou mais, quando cultivado sobre condições naturais). Quanto às características do bulbo, apresenta de 7 a 12 bulbilhos, é de formato redondo e tipo palito; possui alta exigência em fotoperíodo, e temperaturas amenas para indução da bulbificação. Essa cultivar é suscetível ao perfilhamento, produz bulbilhos graúdos e de alta qualidade comercial, o que a torna bastante competitiva no mercado consumidor com o alho importado (RESENDE et al., 2017).

2.3 COMPLEXO VIRAL DO ALHO

As viroses são os maiores problemas na cultura do alho quando se trata da manutenção da alta de produtividade ao longo das gerações de cultivo. A transmissão na maioria dos casos, ocorre por afídeos (pulgões) ou por via mecânica. A principal consequência é a redução do rendimento da cultura através da diminuição do tamanho e peso dos bulbos e bulbilhos. Nesse sentido, a via de controle fundamental é a limpeza por cultura de tecidos, mais precisamente pela técnica da cultura de meristemas (DUSI, 1995; TORRES, 2001).

Segundo Cafrune et al. (2006), o *Allium sativum* geralmente é propagado assexuadamente. Dessa forma, a cultura fica mais suscetível à infecção por uma junção de vírus dos gêneros: Potyvirus e Carlavirus, transmitidos por pulgões, e Allexivirus, por ácaros. Sendo assim, a maioria dos testes sorológicos realizados no Brasil revelam a presença dos Potyvirus “Onion yellow dwarf virus” (OYDV-G); “Leek yellow stripe virus” (LYSV) e do Carlavirus “Garlic common latent virus” GCLV e o Shallot latent

virus (SLV). No último caso, os pulgões são os principais vetores desses vírus (FAJARDO et al., 2001), sendo que o LYSV pode causar sintomas de mosaico, estrias nas folhas, bem como, nanismo da planta; o OYDV pode causar nanismo, clorose leve sem estrias. Desse modo, espécies de potyvirus tornam-se mais frequentemente detectadas, dado que causam maiores danos na cultura (SALOMON, 2002; BAI et al., 2010; KRITZMAN et al., 2010).

Dentre os testes para indexação desses vírus, tem-se a diagnose pelo método sorológico ELISA (BARROCAS et al., 2009) que foi desenvolvido por Clark; Adams (1977). O Dot-Blot (DB), uma prova sorológica baseada no ELISA, um teste atrativo com alta sensibilidade para aplicação de rotina, em virtude dos procedimentos permitirem a realização de dezenas de ensaios em tiras de membrana de nitrocelulose para detecção de anticorpos (DUSI et al., 1994; FAYAD ANDRÉ, 2010). Dentre as técnicas moleculares a PCR (para vírus de DNA) e RTPCR (para vírus de RNA) são as mais aplicadas, pela sensibilidade, especificidade e facilidade de realização em laboratório (BARROCAS et al., 2009). Atualmente a técnica RT-PCR (transcriptase reversa da reação em cadeia da polimerase) que é uma variação da técnica de PCR é uma das técnicas mais utilizada na detecção de viroses em plantas de diversas espécies, incluindo o alho (BARROCAS et al., 2009).

2.4 CULTURA DE MERISTEMAS PARA LIMPEZA VIRAL

Dentre as vantagens da micropropagação vegetal, cita-se: a produção rápida de matérias propagativos livres de doenças e pragas e elevada qualidade genética e fitossanitária em tempo reduzido. Além disso, por meio dessa técnica é possível produzir grandes quantidades de plantas, sem influência das variações climáticas (ROCHA, 2009).

A cultura de ápices meristemáticos e caulinares tem sido utilizada para a propagação de plantas *in vitro*, recuperação de plantas livres de vírus, conservação e intercâmbio de germoplasma. O domo meristemático ou cultura de meristemas é empregado em casos específicos pela dificuldade de retirada e sobrevivência *in vitro*, necessitando de meios de culturas específicos para tal. Os primórdios foliares, presentes nos ápices caulinares em desenvolvimento, sintetizam substâncias orgânicas essenciais que favorecem o crescimento *in vitro*. Devido a isso, o uso de ápices meristemáticos ou caulinares, com 0,2 a 0,5 mm, tem sido preferido (TORRES et al., 1998; PASQUAL et

al., 2001). Nesse sentido, a cultura de meristema é uma ferramenta de grande importância para o trabalho de limpeza viral, em especial em bulbosas, como é o caso do *Allium sativum*.

O meio de cultura, geralmente, deve ser composto por macro e micronutrientes acrescidos de reguladores de crescimento e/ou vitaminas. A fórmula que compõe o meio de cultura Murashige (SKOOG, 1962) é a mais utilizada em larga escala nos processos de cultivo *in vitro*, podendo variar a concentração em função da espécie ou do objetivo do trabalho (CID; TEIXEIRA, 2014). O tipo de explante ou o objetivo do trabalho será o fator que determinará a composição do meio de cultura.

Na micropropagação, fatores como o tipo de explantes, concentração de sacarose, iluminação e os meios nutritivos e suas composições são alguns fatores importantes responsáveis pela manutenção do material vegetal *in vitro* (CID, 2014).

2.4.1 Efeito da concentração de sacarose no cultivo *in vitro*

A sacarose é um composto essencial para o desenvolvimento das plantas, visto que a fotossíntese da planta ou do explante é limitada. Esse é um dos carboidratos mais aplicados na preparação de meios nutritivos. Sua concentração mais usual varia de 2% a 3%, no entanto, ocasionalmente, ela pode ser empregada em concentrações maiores, de até 6%, como no caso de embriões, na indução de bulbilhos de alho ou na tuberização em raízes de mandioca. Além disso, a sacarose é parcialmente hidrolisada na sua passagem pela autoclave em glicose e em frutose (CID, 2014).

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 após o processo de autoclavagem 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; RAVNIKAR et al., 1993; MOHAMED-YANSSEEN et al., 1994).

Cientistas relatam a 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. Além disso, demonstraram que a adição de ácido Jasmônico (AJ) no meio de cultura com 8% de sacarose foi superior na formação de bulbo (Zel et al., 1997).

Nessa mesma linha de estudo, Ravnikar et al. (1993) relataram um efeito sinérgico entre ácido Jasmônico e a sacarose apenas em relação ao número de bulbos formados, o que não afeta o seu diâmetro, porém, propicia 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 2-isopenteniladenina (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 referida concentração de sacarose na formação de bulbo também foi observado para *Allium cepa* (KELLER, 1993).

Bach et al. (1992) testaram os efeitos de diferentes fontes de carboidratos sobre a formação de bulbos de *Helleborus orientalis*, usando folhas como explantes e constataram que meios com 30g L⁻¹ de frutose produziram mais bulbilhos. O uso de concentrações crescentes dos monossacarídeos frutose e glicose, isoladamente ou em mistura equimolar, estimulou 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, diâmetro de bulbo 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%. Esse resultado não foi observado para a quantidade 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⁻¹). No trabalho realizado por Longo et al. (2012) a micropropagação e bulbificação *in vitro* utilizando a concentração de 50 g L⁻¹ de sacarose, apresentou a melhor resposta para razão bulbar e massa fresca de bulbos.

Além do aporte energético do meio fornecido pela quantidade ideal de carboidratos, outra condição de extrema importância que deve ser controlada no cultivo *in vitro* é o controle do microambiente para evitar contaminações até problemas como hiperhidricidade.

2.4.2 Influência da troca gasosa no microambiente

No cultivo *in vitro*, o material vegetal está sob constante estresse, isso porque o material excisado da planta mãe é submetido a condições como: meio de cultivo artificial, condições assépticas e, normalmente, é acondicionado em recipientes em sua maioria, de vidro ou polipropileno. Como esses recipientes permanecem fechados, pode ocorrer acúmulo de gases, muitas vezes tóxicos para o material vegetal a ser multiplicado. Uma maneira de alterar este microambiente é a utilização de frascos 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).

Aragón et al. (2010) argumentam que as baixas concentrações de CO₂ e etileno, acumuladas em frascos vedados, podem ser fatores limitantes na obtenção de melhor desempenho nas taxas fotossintéticas *in vitro* de plantas, bem como em sua taxa de multiplicação e sobrevivência durante a aclimatização. Para Hazarika (2006), a umidade relativa dentro dos frascos é outro aspecto que deve ser ponderado, já que pode causar anomalias anatômicas que geralmente reduzem a sobrevivência taxa durante a aclimatização.

Um dos principais problemas na cultura de tecidos ocorre na fase de aclimatização, na qual são perdidas grande parte das plantas, pois não possuem sistema radicular efetivo, aparato fotossintético eficaz, além de apresentarem pouca pilosidade e cerosidade nas folhas, o que permite a perda de água com facilidade para o meio externo, resultando na morte por desidratação. Quando uma planta é bem formada *in vitro*, ela apresenta melhores condições de superar as adversidades que irá encontrar durante o processo de aclimatização (BANDINELLI et al., 2013).

Em um estudo realizado para avaliar a influência de trocas gasosas e da fonte de explantes na morfogênese *in vitro* de pimenteira ornamental, sementes de *Capsicum annuum*, foi constatado que o tipo de vedação influenciou nas respostas morfológicas em pimenteira, demonstrando que o aumento nas trocas gasosas tem um efeito positivo sobre a produção de biomassa e aclimatização das plântulas (GRIS et al., 2021).

O tipo de vedação utilizado no frasco é um fator determinante na qualidade do microambiente no interior dos frascos por influenciar nas trocas gasosas com o ambiente externo. Tampas que vedam totalmente o frasco facilitam a prevenção de contaminações, mas em contrapartida não permitem trocas gasosas adequadas prejudicando o desenvolvimento de determinadas plantas. Isso ocorre principalmente devido à saturação

com gases que induzem a senescência e/ou hiperhidricidade podendo tornar as plantas menos rústicas e mais sensíveis a fase de aclimatização comprometendo assim a etapa *ex vitro* (WOJTANIA; WĘGRZYNOWICZ-LEŚIAK., 2012).

2.4.3 Importância da qualidade luminosa no cultivo *in vitro*

A qualidade da luz afeta a eficiência biológica dos fitorreguladores adicionados ao meio de cultura e o balanço dos fitormônios nos tecidos, além disso a irradiância luminosa também afeta diretamente a hiperhidricidade. Na fotossíntese, os pigmentos vegetais absorvem de forma mais eficiente a energia no comprimento de onda na faixa do azul (390 a 500 nm) e do vermelho (600 a 700 nm), refletindo a cor verde, característica da maioria das folhas (ERIG; SCHUCH, 2005).

O crescimento das plantas pode refletir na habilidade de adaptação das espécies às condições de radiação do ambiente em que estão se desenvolvendo (ALMEIDA et al., 2005). Os fitocromos são capazes de reconhecer diferentes informações relacionadas à luz, incluindo intensidade, comprimento de onda e duração do sinal luminoso, de modo que estes sinais são traduzidos para desenvolver quase todas as etapas do ciclo de vida vegetal, dentre eles a germinação de sementes (HAN et al., 2007).

Estudos realizados para avaliar o impacto de diferentes combinações de fotoperíodo e temperatura no crescimento, morfofisiologia e qualidade nutritiva do bulbo de alho, por embriogênese somática de três cultivares de alho, concluíram que as plantas sob a combinação de 14 h–30 °C apresentaram máxima massa fresca, diâmetro de bulbo, menor período de crescimento, máxima qualidade fisiológica e nutritiva do bulbo, enquanto que combinações de 12 h–30 °C resultaram em máxima massa de bulbo e 16 h–30 °C tiveram a altura máxima de planta (SNJEŽANA et al., 2019).

Estudos com outras espécies também têm sido realizados, nesse aspecto Hernandez et al. (2021) analisaram as respostas fisiológicas de mudas de tomateiro sob diferentes porcentagens de fluxo de fótons azul e vermelho usando LEDs e lâmpadas fluorescentes brancas frias e relataram que o comprimento do hipocótilo de mudas da cultivar 'Komeett' diminuiu com o aumento da porcentagem da cor azul (B) em até 75%. A área foliar das plantas foram 64-72% maior nos tratamentos que emitiam cor azul e vermelho que nos tratamentos 100% B e 100% vermelho. Da mesma forma, a massa fresca, massa seca, número de folhas e concentração de clorofila do tomate 'Komeett'

foram comparadas entre os tratamentos contendo B e R em diferentes proporções se mostraram maiores que nos tratamentos 100% B e 100% R.

Gao et al. (2020) testaram os efeitos de diferentes LEDs (branco, W; azul, B; verde, G; amarelo, Y; e vermelho, R) com a mesma densidade de fluxo de fótons ($300 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) no crescimento, desenvolvimento, fotossíntese, características de fluorescência da clorofila, estrutura foliar e ultraestrutura do cloroplasto da cebola galesa (*Allium fistulosum* L.). Os autores afirmaram que as luzes brancas e azuis melhoraram significativamente a eficiência fotossintética das cebolinhas, enquanto a luz amarela reduziu a eficiência fotossintética.

Com relação ao impacto da luminosidade sobre o grau de hiperhidricidade, a literatura reporta que a irradiância luminosa e a temperatura influenciaram a hiperhidricidade das brotações da flor mosquitinho (*Gypsophila paniculata*), uma vez que houve períodos de alta temperatura e outros de baixa luminosidade em virtude de problemas nos equipamentos que mantêm as condições ambientais da sala de crescimento (QUOIRIN et al., 2008; PALMAS, 2011).

2.4.4 Hiperhidricidade

A otimização do cultivo *in vitro* depende do estabelecimento de protocolos que combinem adequadamente os fatores da composição do meio de cultura e condições de cultivo (KERBAUY, 1997). Dado que a menor desordem em qualquer destes fatores pode acarretar em alterações morfofisiológicas negativas no desenvolvimento da planta. Uma vez que a hiperhidricidade é uma das mais importantes dessas desordens no estabelecimento *ex vitro* dessas plantas, reportada pela primeira vez em 1981 por Debergh e colaboradores como ‘vitriificação’, posteriormente substituído pelo termo ‘hiperhidricidade’ pelos mesmos pesquisadores em 1992 (IVANOVA; STADEN, 2009).

Plantas com hiperhidricidade apresentam desordens morfológicas e fisiológicas devido ao elevado teor de água no interior das células e tecidos, podendo atingir 60% dos brotos micropropagados (ZIV, 1991; FONTES, 1998; PARK et al., 2004). Morfológicamente apresentam aspecto translúcido, caules largos e engrossados em diâmetro e com entrenós mais curtos que os de plantas normais, órgãos menos verdes e facilmente quebráveis, menor formação de raízes ou o não enraizamento, hipertrofia do mesófilo e do córtex do caule, hipertrofia das células, maiores espaços intercelulares, ausência de cera em sua cutícula, engrossamento das folhas, visivelmente frágeis, alterações na densidade e distribuição dos estômatos, deformação na espessura das

epiderme e do tecido parenquimático e nas estruturas de defesa mecânica e química, além de menor número de cloroplastos e menor quantidade de clorofila, desorganização dos tilacóides e baixo número de granas, menor número de cloroplastos e menor quantidade de clorofila (DEBERGH et al., 1981; FONTES et al., 1999; FRANCK et al., 1998; GASPER et al., 1991; KEVERS et al., 2004; KEVERS et al., 1984; OLMOS; HELLÍN, 1998; SAEBO, et al. 1995; ZIV, 1991).

Devido a todas essas anomalias incluindo o não funcionamento dos estômatos e portanto perda hídrica facilitada e possível dessecação (DEBERGH et al., 1992), a hiperhidricidade faz com que as plantas não sobrevivam após transferidas para condições *ex vitro* (BERTONI et al., 2006), além de afetar essa importante etapa, dificulta também a sobrevivência e adaptação das plantas após sua transferência para o solo, aumentando também a suscetibilidade ao ataque de patógenos como fungos e bactérias (REUTHER, 1990 Apud RADMANN et al., 2001).

2.5 ETAPAS PARA A PRODUÇÃO DE BULBOS

2.5.1 Vernalização

A técnica de vernalização consiste em submeter o bulbo-semente a baixa temperatura por um determinado período de tempo antes do plantio, estimulando assim a acumulação de hormônios, modificando o equilíbrio hormonal, que inclui o aumento de giberelinas livres e citocininas. Essas mudanças bioquímicas, que são favorecidas por baixas temperaturas e estimulam alterações fisiológicas. As alterações fisiológicas induzidas pela vernalização estão relacionados com a redução do fotoperíodo exigido pelas cultivares (SCOTTON, 2007; FILGUEIRA, 2008).

Com o objetivo de determinar o efeito do GA3 e da vernalização nos caracteres morfológicos e de floração de 5 variedades de cebola, Marli et al. (2021) encontraram resultados que indicaram que a variedade Super Phillip apresentou a maior resposta ao GA3 observada no número de folhas e bulbos. A 100 mg L⁻¹ de GA3 aumentou a altura da planta em até 45,74 cm. Os resultados do segundo estudo mostraram que a vernalização foi efetiva para aumentar a floração apenas na variedade Ilokos. Mas as outras variedades não foram sensíveis à vernalização. Com relação as características do alho semi-nobre submetidos a diferentes períodos de vernalização pré-plantio de bulbos em dois municípios da Mesorregião Ocidental do Estado do Rio Grande do Norte (RN),

Brasil Lucena et al. (2016) perceberam que o uso de 10 dias de vernalização pré-plantio de sementes de bulbo aumentou a qualidade do alho semi-nobre produzido em Baraúna e Governador Dix-sept Rosado. As cultivares Gigante-do-Núcleo e BRS-Hozan apresentaram boas perspectivas de industrialização, com boas características de sabor e aroma.

Azevedo (2019) chegou à conclusão de que a temperatura negativa de vernalização para a cultivar Ito proporcionou maior quantidade de bulbos com classificação 6 a 8 e, conseqüentemente, isso refletiu não somente em maiores produtividades de bulbos, mas também em uma maior qualidade, o que acarreta maior valor comercial da cultura, uma vez que o mercado consumidor de alho prefere bulbos maiores e com número reduzido de bulbilhos/bulbo (LOPES et al., 2016).

2.5.2 Termoterapia na cultura do alho

A termoterapia é uma técnica que permite tratar plantas ou partes delas, submetendo-as a temperaturas maiores do que as exigidas por seu ciclo fenológico. Em geral, quanto maior a temperatura e a duração do tempo de exposição, maior será a frequência de erradicação do vírus. Por vezes, a termoterapia, de 35 a 42 °C, por 4 a 6 semanas, é aplicada às plantas-alvo, a depender do tipo de vírus e da espécie de planta, bem como da combinação vírus-hospedeiro (BARBA et al., 2015 apud MIN-RUI, 2018). A escolha de um regime de termoterapia deve permitir que a planta tratada sobreviva e, ao mesmo tempo, inative o vírus, resultando na produção de plantas livres de vírus.

Wang et al. (2021) descreveram uma combinação de termoterapia (uma temperatura constante de 36°C por 0, 2 e 4 semanas) com cultura de meristema para melhorar a erradicação do vírus do anão amarelo da cebola (OYDV) e do vírus atente do *Allium cepa* (SLV) de brotos de cebola co-infectados cultivados *in vitro*. Os autores atestaram que a combinação de termoterapia com a cultura de meristema melhorou a erradicação de OYDV e SLV dos brotos de cebola (chalota) *in vitro* infectados pelos vírus.

Para Magyar-Tábori et al. (2021), como não existe uma maneira simples de controlar doenças virais em plantas, a eliminação do vírus por esses métodos é de grande importância não apenas na produção de material de propagação livre de vírus de

diferentes espécies vegetais, mas também na preservação de valiosos recursos genéticos. Esses métodos são baseados na aplicação de técnicas de cultura de tecidos *in vitro*, incluindo o isolamento do meristema aplicado isoladamente ou em conjunto com outros tratamentos. Entretanto, cabe citar que basicamente todos os processos de erradicação de vírus também danificam as plantas hospedeiras, mas muitos deles, embora apresentem efeitos nocivos para o hospedeiro, têm a possibilidade de mitigá-los.

Ainda segundo esses mesmos autores, pode-se escolher entre vários métodos para processos de eliminação de vírus, mas as propriedades do vírus a ser eliminado, características da planta hospedeira, as interações entre eles, e todos os fatores que determinam o caminho devem ser considerados. Propriedades do vírus, incluindo seu tipo, distribuição e concentração nas plantas, configuração e resistência ou sensibilidade para calor e produtos químicos devem ser levados em consideração. Da perspectiva da planta, as características da espécie também devem ser consideradas, incluindo seu habitat, ciclos de crescimento e requisitos ambientais (temperatura, duração do dia, etc.). A capacidade de sobrevivência e regeneração das partes de plantas tratadas deve ser aprimorada pela aplicação dos métodos adequadamente selecionados. Pré-condicionamento adequado de plantas-mãe, pré-tratamentos de explantes ou tempo de isolamento do meristema/ponta do broto pode aumentar a taxa de sobrevivência e regeneração de explantes tratados.

Melhorias nos métodos de erradicação dos vírus são de grande importância para aumentar sua eficácia, o que torna necessário desenvolver novas práticas, como novos pré-tratamentos e técnicas para adotar e estender as terapias aplicadas à mais espécies de plantas (MAGYAR-TÁBORI et al., 2021).

2.5.3 Multiplicação de alho-semente em ambiente protegido

O alho é uma cultura naturalmente infectada por viroses, a perda da capacidade de se reproduzir sexuadamente é um dos fatores determinantes para que isso ocorra. Atualmente, através do processo de termoterapia e cultura de tecidos, é possível obter materiais isentos de vírus, os quais possuem vigor elevado e, quando submetidos ao plantio e condução em campo, apresentam desempenho diferenciado em relação aos materiais infectados (NARDINI, 2021).

Na tentativa de manter a qualidade fitossanitária e fisiológica do material propagativo tem-se utilizado o telado antiafídeos para a produção de alho-planta. Esse ambiente de cultivo evita a incidência de vírus ao evitar a presença de pulgões, vetores

eficientes de transmissão de patógenos e pragas que causam na cultura a chamada degenerescência, responsável pela redução da qualidade e quantidade da produção ao longo dos cultivos sucessivos. Apesar de existir poucos trabalhos avaliando a produtividade de alho-planta em telado, já foi relatado, em condições de cultivo protegido, produtividade comercial superior a $9,0 \text{ t ha}^{-1}$, sem ocorrência de superbrotamento (FERNANDES et al., 2010).

O ambiente de cultivo protegido deve ser uma alternativa na produção de alho-semente livre de vírus. Essa metodologia contribui para que a oferta desse produto possa chegar com maior rapidez e qualidade para o produtor, ao mesmo tempo em que o preço final diminui pelo aumento da oferta.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados quatro experimentos, de modo que os experimentos 1 e 2 foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia - UFU, campus Umuarama, localizado no município de Uberlândia - MG, e os experimentos 3 e 4 foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos da empresa Agrícola Wehrmann, situado no município de Cristalina- GO.

Metodologia base a ser otimizada

Torres e colaboradores (2001), utilizam como estratégia para obtenção de microbulbos de alho livre de vírus das cultivares Caçador e Amarante, inicialmente bulbilhos de alho vernalizados em câmara fria a 4°C , até alcançarem o índice visual de superação de dormência de 80%. Em seguida, esses bulbilhos foram submetidos à estufa a 37°C por um período médio de 35 dias para realização da termoterapia. Posteriormente, os ápices com 10 a 20 mm de tamanho foram desinfestados em solução de hipoclorito de sódio a 0.5% durante 20 minutos e lavados em água destilada e autoclavada. O meristema foi então excisado em condições assépticas em câmara de fluxo laminar, por fim inoculado em meio de cultura para regeneração e indução de parte aérea.

Meio de Regeneração

Consistiu no meio de cultura básico composto por sais MS (Mrashige e Skoog, 1962), com adição de 3% de sacarose e 0,2% de gerilte, 100 mg L^{-1} de i-inositol, 2.0 mg L^{-1} glicina, 1.0 mg L^{-1} de tiamina HCl, 0.5 mg L^{-1} piroxidina .HCl, , 0.5 mg L^{-1} ácido nicotínido, , 0.1 mg L^{-1} de isopenteniladenina, e 0.1 mg L^{-1} de ácido indolbutírico. Este

meio é adicionado em um frasco vedado sem troca gasosa. Os explantes são mantidos em câmara de crescimento com intensidade luminosa de $62 \mu\text{mol. m}^{-2}\text{s}^{-1}$, com lâmpadas de LED branca fria, fotoperíodo de 16 horas e temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Após indução da parte aérea, os explantes foram transferidos para o meio de bulbificação para crescimento dos microbulbos.

Meio de Bulbificação

Os explantes foram transferidos para o novo meio, composto por sais MS, 6% de sacarose, 0,2% de gerilte, 100mg L^{-1} de i-inositol, 2.0 mg L^{-1} glicina, 1.0 mg L^{-1} de tiamina HCl, 0.5 mg L^{-1} piroxidina .HCl, , 0.5 mg L^{-1} ácido nicotínido, em um frasco vedado sem troca gasosa.

Após cerca de 70 dias, os microbulbos, que foram mantidos sob o fotoperíodo de 16 horas utilizando lâmpadas de LED branca fria e temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, foram colhidos e secos ao ar, mantidos em câmara fria a 4°C , por 60 dias, para quebra de dormência. Posteriormente a esta etapa, os microbulbos foram plantados em vasos e seguiram para etapa seguinte de indexação viral, a qual utilizou-se o método dot-ELISA em membrana de nitrocelulose, utilizando um anti-soro polivalente. As plantas que apresentaram contaminação foram descartadas e as plantas negativas seguiram para a etapa de multiplicação em casa de vegetação.

Partindo desta metodologia base descrita anteriormente, para realização dos experimentos 1, 2 e 3, sementes vernalizadas a $4^{\circ}\text{C} \pm 1$ e submetidas à termoterapia de 37°C por 30 dias tiveram a excisão de meristemas com até dois primórdios foliares, os quais foram 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).

Etapas utilizadas neste estudo

Fase de regeneração - Para o crescimento inicial, os meristemas foram introduzidos em frascos de vidro (20 unidades) com 15 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado de vitaminas (Tiamina, Piridoxina, Glicina e Ácido Nicotínico), Mio-Inositol (100 mg L^{-1}), 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 $60 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de lâmpadas LED brancas frias.

Fase de bulbificação – As plantas, em fase inicial de desenvolvimento foram transferidas para potes plásticos de 500 mL (6 explantes), contendo 60 mL de meio MS, suplementado de vitaminas, Mio Inositol (100 mg L^{-1}), sacarose (6%), e ácido naftalenoacético ($0,2 \text{ mg L}^{-1}$), 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 três experimentos na fase de Bulbificação. No experimento um, utilizou-se modificações nas tampas para avaliar a interferência do microambiente quando ocorre troca gasosa durante o desenvolvimento *in vitro*. Para o experimento dois, foram utilizadas diferentes concentrações de sacarose no meio de cultivo para analisar o desempenho na fase de bulbificação das cultivares Ito e Quitéria. Já o experimento três teve o intuito de avaliar a interferência da qualidade luminosa na fase de bulbificação, para isso utilizou-se três cores de lâmpadas distintas: azul, branca e vermelha.

No experimento 4 foi avaliado o desempenho no cultivo *in vitro* das plantas de alho quando submetidas a duas diferentes faixas de temperatura de vernalização que são de -1 a -3°C (vernalização em temperatura negativa) e de 2 a 4°C (vernalização em temperatura positiva), isso combinado com diferentes dias de termoterapia a 37°C : 0 dias, 10 dias, 20 dias e 30 dias. Após a realização desses tratamentos prévios de vernalização X termoterapia, os bulbilhos seguiram as etapas de excisão do meristema, regeneração e bulbificação iguais as descritas anteriormente, e posteriormente foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, e fotoperíodo de 16h/luz e intensidade luminosa ajustada para $60 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de lâmpadas LED brancas frias, durante 180 dias.

Experimento 1: Qualidade luminosa

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC). Para os tratamentos utilizou-se as lâmpadas LED (light emission diodo) LEDs azuis (bulbo LED A60 E27 10W, marca Luminatti) que forneceu aproximadamente $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, LEDs vermelhas (bulbo LED A60 E27 10W, marca Luminatti) aproximadamente 40

$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e LEDs brancas fria (bulbo LED E27 9W, marca Kian) que forneceu em média $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para as duas cultivares de alho nobre (Ito e Quitéria), resultando no total de três tratamentos, e quinze repetições. Cada parcela experimental foi composta por um copo plástico (COPOBRAS) DE 500 mL contendo 6 explantes e tampas sem filtros. As variáveis analisadas foram: número de bulbificação em unidades; número de brotos por plantas (NBP) em unidades; diâmetro de bulbos (DB) em milímetros, medidos com paquímetro; massa fresca de bulbo (MFB) em gramas, obtidas em balança de precisão (Quimis).

Experimento 2: Diferentes microambientes

Foram testados frascos com três tipos de tampas de polietileno com e sem filtro: sem filtro (testemunha), 1 filtro e 2 filtros, adotando-se delineamento experimental inteiramente casualizados com três tratamentos e quinze repetições para ambas as cultivares Ito e Quitéria. Cada parcela experimental foi composta por um copo plástico (COPOBRAS) DE 500 mL contendo 6 explantes. As variáveis analisadas foram: número de bulbificação em unidades; número de brotos por plantas (NBP) em unidades; diâmetro de bulbos (DB) em milímetros (mm), medidos com paquímetro; massa fresca de bulbo (MFB) em gramas, obtidas em balança de precisão da marca (Quimis).

Experimento 3: Concentrações de sacarose

Foram estudadas seis concentrações de sacarose (0, 2, 4, 6, 8 e 10%) adicionadas ao meio de bulbificação para as cultivares Ito e Quitéria, adotando-se delineamento experimental inteiramente casualizados com 6 tratamentos e 10 repetições. Cada parcela experimental foi composta por um copo plástico (COPOBRAS) DE 500 mL contendo 6 explantes e tampas sem filtros. As variáveis analisadas foram: porcentagem de plantas com formação de bulbos (%); número de bulbos por planta (NBP) em unidades; diâmetro de bulbo (DB) mensurada com o auxílio de um paquímetro (mm); massa fresca de bulbo (MFB) em gramas, obtidas em balança de precisão (Quimis) de plântulas *in vitro* de alho (*Allium sativum*) das cultivares Ito e Quitéria

Experimento 4: Vernalização X termoterapia

Foram combinados 2 faixas de temperaturas de -1 a -3°C (vernalização em temperatura negativa) e de 2 a 4°C (vernalização em temperatura positiva), com diferentes

dias de termoterapia: 0 dias, 10 dias, 20 dias e 30 dias, adotando-se delineamento experimental inteiramente casualizados com esquema fatorial 2x4 com 8 tratamentos e com 18 repetições. Cada parcela experimental foi composta por um tubo de ensaio contendo 1 explantes e tampas plásticas sem filtros. O experimento foi realizado para cada cultivar isoladamente.

As características analisadas em todos os ensaios foram: Massa fresca de Bulbo (MFB), Número de bulbos por planta (NBP) e Diâmetro de bulbo (DB), bem como a taxa de bulbificação, percentual de plantas vitrificadas por meio da atribuição de uma escala de notas, proposta pela autora, notas de 1 a 5 a saber:

- 1 plantas muito vitrificadas e;
- 5 plantas que não apresentam nenhum grau dessa anomalia;
- 2 a 4 intermediárias;

É de interesse plantas que produzam maior quantidade de microbulbos, e estas deverão ter notas entre 4 e 5), escala representada na Figura 1.

No experimento 4 foi analisado o percentual de incidência viral, e qualidade fitossanitária dos bulbilhos doadores de explantes.

FIGURA-1: Escala de notas para diferentes graus de hiperhidricidade



Fonte: Metodologia de Escala de notas para diferentes graus de hiperhidricidade proposta pela autora. 2022.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de F da análise de variância a 0.05 de significância, após o atendimento das pressuposições de homogeneidade de variâncias (Levene), normalidade dos resíduos (SHAPIRO WILK). Se significativo, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, além disso, foi realizado o teste de correlação de Pearson para as variáveis.

Para os tratamentos que, mesmo após a transformação, não atenderam as pressuposições, procedeu-se com a análise de Kruskal-Wallis, na qual não há a exigência desses pressupostos. Nesses casos, as médias foram comparadas pelo teste de Bonferroni,

para determinar quais tratamentos se diferenciam entre si. Todas as análises foram realizadas utilizando o Software R e o nível de significância adotado neste trabalho foi de 0,05.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IMPACTO DA QUALIDADE LUMINOSA

Ao observar a Tabela 1, nota-se que para todas as variáveis analisadas de plantas das cultivares tanto Ito quanto Quitéria da espécie *Allium sativum*, oriundas do cultivo *in vitro* apresentaram diferença estatística significativa entre os tratamentos utilizando lâmpadas LEDs azuis, brancas e vermelhas.

Para porcentagem de bulbificação da cultivar Ito, todos os tratamentos apresentaram 100% de bulbificação. Em contraposição, para a cultivar Quitéria os maiores valores médios desse percentual, foi expresso quando se utilizou LEDs azuis (100%), e os menores percentuais médios foi com a utilização de LEDs vermelhos (20%), e as lâmpadas LEDs brancas apresentaram resultado intermediário (45%).

TABELA-1: Efeito das fontes luminosas: LEDs azuis, LEDs brancas e LEDs vermelhas sob as variáveis: porcentagem de plantas com formação de bulbos, número de bulbos por planta (NBP), diâmetro de bulbo (DB), massa fresca de bulbo (MFB), de plântulas *in vitro* de alho (*Allium sativum*) das cultivares Ito e Quitéria - Uberlândia-MG, 2021.

Tipo de lâmpada	% bulbificação		NBP		DB (mm)		MFB (g)	
	Ito	Quitéria	Ito ¹	Quitéria ¹	Ito ²	Quitéria ¹	Ito ¹	Quitéria ²
Azul	100	100	5.09 a	1.56 a	4.41 b	3.17 b	0.62 a	0.25 a
Branca	100	45	3.78 b	0.45 b	5.45 a	5.48 a	0.47b	0.21 ab
Vermelha	100	20	1.69 c	0.19 c	4.92 ab	5.55 a	0.33 c	0.13 b
Média	100	55	3.52	0.73	4.93	4.73	0.47	0.20
P-valor			4.23x10 ⁻⁶	2.56x10 ⁻⁴		1.71x10 ⁻⁵	2.09x10 ⁻⁵	
Kruskal-Wallis					<0.00			2.0x10 ⁻²
CV (%)			19.64	20.75	16.19	21.03	12.54	24.64

¹Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, ²Teste χ^2 significativo. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. ³ Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Bonferroni, duas a duas, a 5% de probabilidade.

Com relação ao NBP (Tabela 1), para a cultivar Ito os LEDs azuis apresentaram maiores valores médios (5,09), seguido dos LEDs brancos (3,78) e os menores resultados foram expressos quando utilizado os LEDs vermelhos (1,69). Para a cultivar Quitéria apresentou o mesmo padrão de resultados, sendo os melhores resultados utilizando a luz azul (1,56), e os menores valores com a luz vermelha (0,19), e novamente a luz branca

apresentou resultados intermediários quando comparada com os outros dois espectros luminosos.

Para a característica DB, a cultivar Ito exibiu maiores valores médios quando submetida aos LEDs brancos (5.45), e os menores valores foram expressos com o uso de LEDs azuis (4.41), os LEDs vermelhos (4.92),) apresentaram valores intermediários, os quais não se diferiram estatisticamente dos valores quando utilizados LEDs azuis ou brancos. Novamente a cultivar Quitéria apresentou um padrão de resultados semelhantes, sendo para LEDs azuis os menores valores (3.17) e os maiores valores com uso de LEDs vermelhos (5.55), o qual não se diferiu estatisticamente do tratamento utilizando LEDs brancos (5.48).

Considerando os resultados para MFB, a cultivar Ito expressou o mesmo padrão de resultados que em NBP, uma vez que essas duas características apresentam uma relação diretamente proporcional. Para a cultivar Quitéria os resultados também foram semelhantes, sendo LEDs azuis os maiores valores médios (0.25g), os menores valores para os LEDs vermelhos (0.13g), e os LEDs brancos exibindo valores intermediários (0.21g) não diferindo estatisticamente nem dos tratamentos utilizando luz azul e nem vermelha.

O comprimento de onda de 450 nm emitido pela luz azul apresentou resultados superiores em todos os parâmetros analisados para ambas as cultivares, com exceção da característica DB. Em seguida a luz branca emitindo na faixa de 400 a 700 nm de modo geral apresentou resultados intermediários e a luz vermelha que emite radiação na faixa de 660 nm resultou nos menores valores médios de porcentagem de bulbificação para Quitéria menor quantidade de bulbos por planta, e menor massa de bulbos para ambas as cultivares.

A absorção da luz azul pelas clorofilas promove um estado energético maior do que em relação à luz vermelha devido à maior energia existente na luz azul (TAIZ; ZEIGER, 2013). Essa energia de excitação da molécula de clorofila pode ser utilizada na etapa fotoquímica, ser perdida na forma de calor ou mesmo gerar danos ao aparato fotossintético como a formação de radicais livres azul (TAIZ; ZEIGER, 2013). Assim, a quantidade de luz azul exigida ou ótima pelas diferentes espécies de plantas é uma constante pergunta feita pelos pesquisadores (MASSA et al., 2008; LAZZARINI et al., 2017).

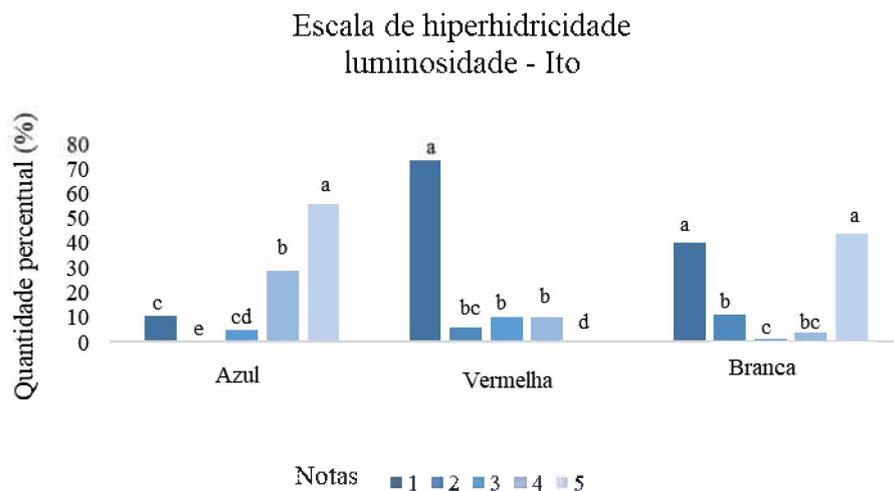
Apesar da utilização dos LEDs azuis resultarem em maior número de bulbos por plantas, eles também se mostraram ser o tratamento em que o diâmetro desses bulbos foi

significativamente menor. Esses resultados podem ser comparados com a literatura, em que para algumas espécies como a *Rehmania glutinosa* (MANIVANNAN et al., 2015), *Plectranthus amboinicus* (NOGUCHI; AMAKI, 2016), *Solanum lycopersicum*, *Cucumis sativus* e *Capsicum annum* (SNOWDEN et al., 2016), verificaram uma redução do crescimento quando as plantas se desenvolviam sob LED azul. Sendo assim, surge a necessidade de estudos que visem a combinação de LEDs para a obtenção de um crescimento eficiente nas plantas (HOENECKE et al., 1992; LAZZARINI et al., 2017).

Embora os LEDs vermelhos tenham um grande potencial como fonte luminosa para favorecer a fotossíntese, as plantas são adaptadas a utilizar um amplo espectro de luz para controlar as respostas fotomorfogênicas (KEODRICK; KRONENBERG, 1994). Tanto a luz vermelha, via fitocromo, e a luz azul, via fotorreceptores, são efetivas na indução de respostas fotomorfogênicas. De maneira geral, o uso de espectros na região do azul e vermelho pode ser uma proposta para maior eficiência no desenvolvimento de plantas cultivadas. Entretanto, são necessários estudos que contemplem essas repostas, pois são muito dependentes da espécie a ser cultivada (LAZZARINI et al., 2017).

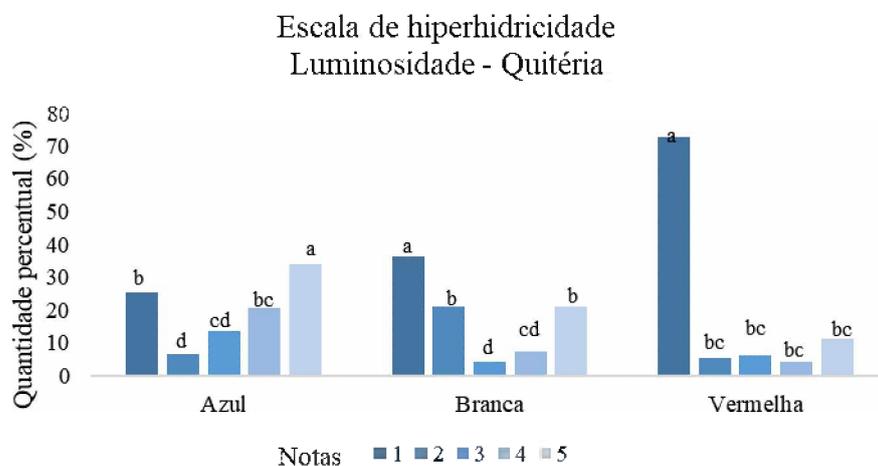
Os resultados obtidos decorrentes da resposta à luz azul, possivelmente está relacionada ao fato de que a luz azul desempenha uma série de funções morfogênicas, além de regular processos metabólicos, influenciar a produção e o crescimento vegetal, influenciar positivamente o desenvolvimento de cloroplastos e a biossíntese de moléculas de clorofila (TAIZ; ZEIGER, 2013; LAZZARINI et al., 2017). Igualmente, os resultados observados no presente trabalho corroboram aqueles verificados no cultivo *in vitro* de *Platycodon grandiflorum*, em que também foi obtido o maior número de folhas sob os LEDs azuis (LIU et al., 2014; STEFANEL et al., 2020)

Com relação ao grau de hiperhidricidade (Figuras 2 e 3), a estatística descritiva dessa característica morfológica (cor), evidencia que o tratamento utilizando LEDs azuis obteve como resposta, plantas que produziram maior quantidade média de microbulbos com notas 4 e 5 ou seja, o maior percentual de plantas que não apresentaram essa anomalia, para ambas as cultivares. Já a luz vermelha apresentou o menor resultado uma vez que mais de 70% dos microbulbos avaliados receberam notas 1 e 2. A luz branca apresentou resultado intermediário.



Médias seguidas de mesma letra minúscula dentro de cada tratamento não se diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

FIGURA-2: Valores percentuais médios, das notas atribuídas de acordo com o grau de hiperhidricidade aos microbulbos advindos das plântulas *in vitro* de alho (*Allium sativum*) cultivar Ito, submetida a fontes luminosas: LEDs azuis, LEDs brancos e LEDs vermelhos - Uberlândia-MG, 2021.



Médias seguidas de mesma letra minúscula dentro de cada tratamento não se diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

FIGURA-3: Valores percentuais médios, das notas atribuídas de acordo com o grau de hiperhidricidade aos microbulbos advindos das plântulas *in vitro* de alho (*Allium sativum*) cultivar Quitéria, submetida a fontes luminosas: LEDs azuis, LEDs brancos e LEDs vermelhos - Uberlândia-MG, 2021.

No que concerne às condições de luminosidade, uma incubação inicial em presença de luz com intensidade de 20 a 70 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$, é geralmente o suficiente para gerar uma boa resposta morfológica *in vitro* (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998). Entretanto para este estudo essa incidência luminosa estabelecida para a espécie *Allium sativum* foi de 60 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$, por ter sido a intensidade que apresentou melhor resposta (LED azul) com relação ao grau de hiperhidricidade, sendo então 40 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ muito baixa (LED vermelho) e 90 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ (LED branco) uma intensidade muito alta (PALMAS et al., 2011).

Esses resultados estão de acordo Mills et al. (2009), que observou a redução nos valores de hiperhidricidade nos brotos de *Simmondsia chinensis* quando essas plântulas foram cultivadas sob alta irradiância combinada com alta ventilação. A eficiência desempenhada por específicos espectros de luz na produção de plantas cultivadas varia entre as espécies, sendo necessária, muitas vezes, uma combinação de distintos espectros de luz. (TRIPATHY; BROWN, 1995; GOINS et al., 1997; MUNEER et al., 2014).

Experimento 2: Microambientes

A cultivar Ito (Tabela 2) apresentou uma taxa de 100% de bulbificação nos três microambientes em que foi cultivada, para as características NBP mesmo o teste de médias não apresentando diferença estatística significativa, nota-se que numericamente quando cultivada em microambiente com tampas contendo 1 filtro que essa cv expressou maior quantidade de número de bulbos por plantas (4.56), com relação ao diâmetro de bulbos, microambientes que não continham filtros nas tampas (5.11). Já para a MFB a variedade Ito também não apresentou diferença estatística significativa.

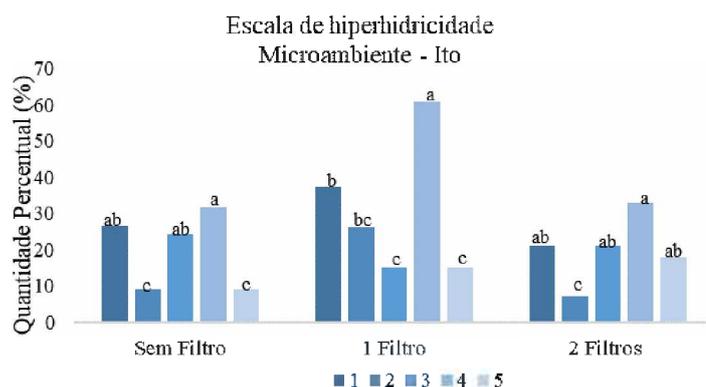
Todavia, a cultivar Quitéria teve melhor desempenho em todas as características analisadas quando cultivada em microambiente utilizando tampas sem filtros, com 80 % de bulbificação, média de 1.88 bulbos por plantas, diâmetro de bulbo de 5.55 mm e média de 0.370g de massa fresca de bulbo. Já os menores desempenhos também para todas as características foram visualizados em microambiente com 2 filtros, com 45% de bulbificação, média de 0.91 bulbos por plantas, diâmetro médio dos bulbos de 3.17 mm, e 0.200 g de massa fresca de bulbos. Os microambientes com tampas contendo 1 filtro apresentaram comportamento intermediário, com taxa de bulbificação de 65%, NBP (0.96), DB (5.48 mm) e MFB (0.270g).

TABELA-2: Efeito dos diferentes microambientes: tampas sem filtro, tampas com 1 filtro e tampas com 2 filtros sob as características: porcentagem de plantas com formação de bulbos, número de bulbos por planta (NBP), diâmetro de bulbo (DB), massa fresca de bulbo (MFB), de plântulas *in vitro* de alho (*Allium sativum*) das cultivares Ito e Quitéria - Uberlândia-MG,2021

Microambiente	% bulbificação		NBP		DB (mm)		MFB (g)	
	Ito	Quitéria	Ito	Quitéria	Ito	Quitéria	Ito	Quitéria
Tampa sem filtro	100	80	3.60	1.88 a	5.26 a	5.55	0.34	0.37 a
Tampa c/1 filtro	100	65	4.56	0.96 b	4.64 b	5.48	0.33	0.27ab
Tampa c/2 filtros	100	45	3.95	0.91b	5.11 a	3.17	0.30	0.20 b
Média	100	70	4.03	0.73	2.14	4.73	0.47	1.99
P-valor			1.18x10 ⁻¹		6.38x10 ⁻³		1.49x10 ⁻¹	6.12x10 ⁻³
Kruskal-Wallis			<0.00		9.0x10 ⁻²			
CV (%)			14.76	24.99	13.14	22,38	23.56	25.90

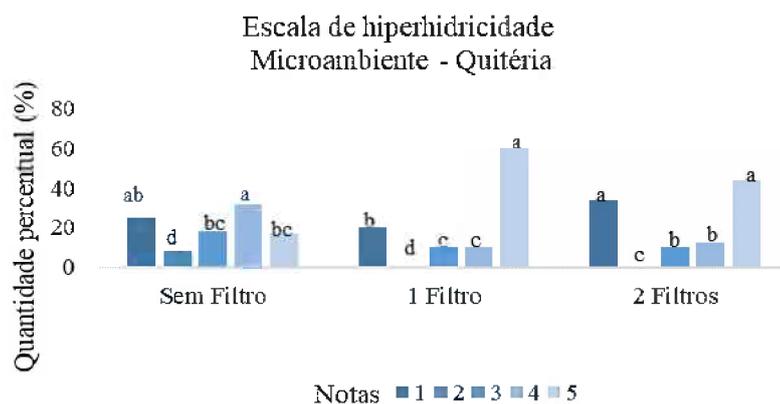
^{ns)} não significativo ¹⁾Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, ²⁾Teste χ^2 significativo. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Bonferroni duas a duas, a 5% de probabilidade.

Analisando os dados numéricos relacionados a produtividade, não são justificados os gastos para o cultivo do alho *in vitro* em microambiente que contenha trocas gasosas, entretanto outro dado relevante que deve ser levado em consideração é o da qualidade desses microbulbos formados com relação ao grau de hiperhidricidade dos mesmos, uma vez que como citado anteriormente essa anomalia é um fator limitante na cultura de tecidos, mais precisamente na fase de aclimatização. Os resultados estão dispostos nas Figuras 4 e 5.



Médias seguidas de mesma letra minúscula dentro de cada tratamento não se diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

FIGURA-4: Valores percentuais médios, das notas atribuídas de acordo com o grau de hiperhidricidade aos microbulbos advindos das plântulas *in vitro* de alho (*Allium sativum*) cultivar Ito, submetida a distintas fontes microambiente: tampas sem filtros, tampas com 1 filtro e tampas com 2 filtros – Uberlândia-MG, 2021.



Médias seguidas de mesma letra minúscula dentro de cada tratamento não se diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

FIGURA-5: Valores percentuais médios, das notas atribuídas de acordo com o grau de hiperhidricidade aos microbulbos advindos das plântulas *in vitro* de alho (*Allium sativum*) cultivar Quitéria, submetida a distintas fontes microambiente: tampas sem filtros, tampas com 1 filtro e tampas com 2 filtros – Uberlândia-MG, 2021.

Os dados revelam que o microambiente em que os microbulbos de *Allium sativum* apresentaram menor grau de hiperhidricidade (maior quantidade de microbulbos com notas 4 e 5) quando cultivados em microambiente com tampas contendo um filtro para ambas as cultivares. Em microambiente com tampas com dois filtros ou mesmo em microambiente sem troca gasosa os resultados apresentam um comportamento semelhante. Para o microambiente sem trocas gasosas, o resultado pode ser atribuído ausência de trocas entre o ambiente interno dos frascos e o meio externo acarretando na modificação da composição gasosa nos frascos, como o acúmulo de voláteis que podem inibir o crescimento das plantas e a fotossíntese (PARK et al., 2004; PALMA et al., 2011).

Além disso, grande quantidade de CO₂ é liberado durante o crescimento dos tecidos, podendo afetar significativamente a transpiração, a fotossíntese e estimular a biossíntese de etileno, um indutor de hiperhidricidade. Assim, um pré-requisito essencial para superar a hiperhidricidade é remover os gases acumulados no meio de cultivo (IVANOVA; STADEN, 2010). Entretanto ressalta-se que no microambiente com dois filtros, a formação de microbulbos com notas 4 e 5 não foi expressiva, esse fato pode estar relacionado com a umidade relativa do ar da sala de crescimento. Ambientes com elevado índice umidade favorecem a hiperhidricidade, possivelmente essa quantidade de filtros maiores que a necessária, permitiram uma maior entrada de umidade para o interior dos frascos (PALMA et al., 2011).

Outra observação feita durante a realização deste experimento, foi que plântulas cultivadas em microambiente com tampas contendo dois filtros atingiram maturação em média acima de 120 dias após transferência para o meio de bulbificação, e com tampas de um filtro em média 110 dias, e as cultivadas sem troca gasosa por volta de 90 dias, esses valores podem ser explicados pelo fato que, ao permitir as trocas gasosas, o CO₂ entra frequentemente no frasco, ocasionando uma redução significativa na umidade relativa no interior dos frascos de cultivo, quanto uma diminuição nas concentrações de etileno, hormônio ligado diretamente com a senescência vegetal (KOZAI; NGUYEN, 2003).

Portanto, o emprego dos filtros 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 (Ψ_w) e o potencial de pressão (Ψ_p) levando a perda da turgescência das células (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Experimento 3: concentrações de sacarose

Observa-se (Tabela 3) que a partir da concentração de 2% de sacarose até o limite de 10% adicionadas ao meio de cultivo, existe um incremento crescente na indução dos microbulbos de alho, tanto para a cultivar Ito, quanto para a cultivar Quitéria, para todas as características analisadas no que tange a formação desses órgãos de armazenamento.

O aumento adicional no tamanho e peso do bulbo é desejável do ponto de vista prático na micropropagação, pois a produção de microbulbos de maiores diâmetros evita perdas na etapa seguinte da micropropagação de plantas cultivadas *in vitro*, que é a etapa de aclimatização dessas plantas. Também é de extrema importância uma maior do ponto de vista econômico, plântulas que apresentem o maior número de bulbos por planta.

Esses resultados estão em conformidade com os descritos por Vieira (2012), em 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 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⁻¹). No trabalho realizado por Longo et al. (2012) a micropropagação e bulbificação *in vitro* utilizando a concentração de 50 g L⁻¹ de sacarose, apresentou a melhor resposta para razão bulbar e massa fresca de bulbos.

TABELA-3: Efeito das concentrações de sacarose (0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%) sob as variáveis: porcentagem de plantas com formação de bulbos, número de bulbos por planta (NBP), diâmetro de bulbo (DB), massa fresca de bulbo (MFB), de plântulas *in vitro* de alho (*Allium sativum*) das cultivares Ito e Quitéria - Cristalina-GO, 2021.

Concentrações de sacarose	% bulbificação		NBP		DB (mm)		MFB (g)		
	Ito		Quitéria ²		Ito ²		Quitéria ²		
	Quitéria	Ito ²	Quitéria ²	Ito ²	Quitéria ²	Ito ¹	Quitéria ²		
0%	-	-	-	-	-	-	-	-	
2%	40	35	0.22 c	0.11 bc	3.22 c	3.23 b	0.11 b	0.08 c	
4%	79	43	2.14 b	0.24 b	5.00 ab	3.69 ab	0.19 b	0.12 bc	
6%	98	60	2.93 b	0.34 b	5.19 ab	3.87ab	0.29 a	0.14 bc	
8%	100	80	4.06 a	1.0 a	5.23 ab	4.10 a	0.36 a	0.17 ab	
10%	100	80	4.23 a	1.33 a	5.40 a	4.31 a	0.32 a	0.20 a	
Média	83.4	63	2.26	0.60	4.80	3.84	0.25	0.14	
P-valor								7.1810 ⁻⁸	
Kruskal-Wallis			<0.00	<0.00	0.001	0.01	<0.00		
CV (%)			32.67	31.04	37.98	27.51	26.65	40.12	

^{ns)} não significativo ¹⁾Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, ²⁾Teste χ^2 significativo. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro. ³⁾Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis duas a duas, a 5% de probabilidade de erro.

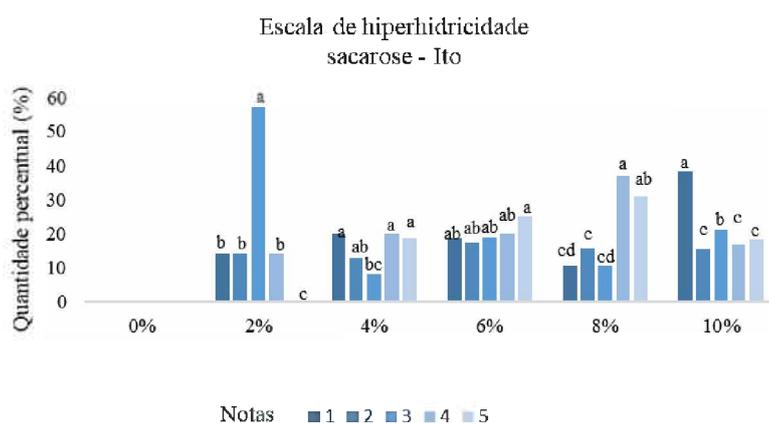
O excesso de sacarose adicionado ao meio de cultura, ainda pode trazer aumento no custo de produção do cultivo *in vitro*, não pelo preço de mercado, uma vez que sua aquisição necessita de um custo relativamente baixo, mas sim pela probabilidade do risco de contaminação *in vitro*. Dado que a sacarose 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), as elevações de níveis de carboidratos impactam na formação e no crescimento de órgãos de armazenamento. Ele traz as seguintes hipóteses correntes para explicar o fato desse aumento resultar no incremento crescente, a primeira hipótese é de que 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 a hipótese alternativa ou complementar é que 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.

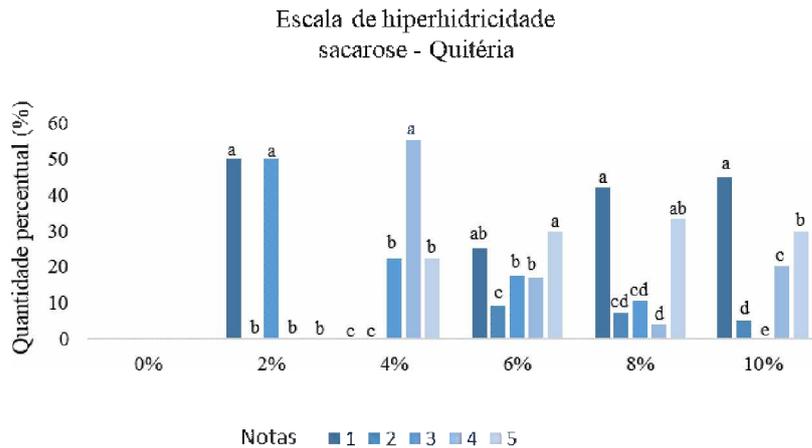
Com relação a porcentagem de bulbificação, a cultivar Ito se mostrou mais responsiva mesmo em menores concentrações de sacarose, que a cultivar Quitéria, essa resposta possivelmente está relacionada à outros fatores ligado ao meio de cultivo, que não foram estudadas neste trabalho, dado que a cultivar Quitéria apresentou menores taxas de bulbificação, comportamento este muito semelhante nos outros experimentos avaliados ao decorrer deste projeto, indicando assim a necessidade de alterações de outros fatores. 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 (MAROUELLI; LUCINI, 2014). Deste modo é indicado que mais estudos sejam realizados com a cultivar Quitéria e seu meio de cultivo.

Analisando o grau de hiperhidricidade (Figuras 6 e 7) a cultivar Ito demonstrou maior qualidade dos microbulbos produzidos com a concentração de sacarose de 8%, e para a cultivar Quitéria as concentrações de 4 a 8% os resultados foram positivos, uma vez que obtiveram um alto percentual de microbulbos com notas 4 e 5.



Médias seguidas de mesma letra minúscula dentro de cada tratamento não se diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade

FIGURA-6: Valores percentuais médios, das notas atribuídas de acordo com o grau de hiperhidricidade aos microbulbos advindos das plântulas *in vitro* de alho (*Allium sativum*) cultivar Ito, submetida a concentrações de sacarose adicionadas ao meio de bulbificação (0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%) - Cristalina-GO, 2021



Médias seguidas de mesma letra minúscula dentro de cada tratamento não se diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade

FIGURA-7: Valores percentuais médios, das notas atribuídas de acordo com o grau de hiperhidricidade aos microbulbos advindos das plântulas *in vitro* de alho (*Allium sativum*) cultivar Quitéria, submetida a concentrações de sacarose adicionadas ao meio de bulbificação (0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%)-Cristalina-GO, 2021.

De acordo com a literatura a adição de sacarose no cultivo *in vitro* de *Cochlospermum regium*, acarretou na diminuição na porcentagem e intensidade de hiperhidricidade conforme o aumento de sua concentração no meio de nutritivo até o nível de 9% (INÁCIO, 2010; PALMA et al., 2011). Entretanto Vieira (2012) observou um efeito negativo com relação a diminuição na massa fresca dos microbulbos de *Allium sativum* produzidos sob a concentração de sacarose de 12%. Sendo assim supõe-se que o aumento até o limite de 9% de sacarose pode ser utilizada como ferramenta aliada na redução da hiperhidricidade, além de proporcionar um melhor desenvolvimento para os explantes. Entretanto é necessário atentar-se que para algumas espécies, concentrações de sacarose acima de 10 % podem reduzir o potencial osmótico (Ψ_s) do meio de cultura, fazendo com que o potencial hídrico (Ψ_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; VIEIRA, 2012; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Experimento 4: Vernalização X termoterapia

Os resultados evidenciam que, a medida em que aumentam a quantidade de dias de termoterapia, a indução dos microbulbos tendem a diminuir, assim como o valor médio de seus diâmetros e massa fresca dos mesmos. Também é possível constatar que (Tabela 4) na faixa de temperatura de vernalização negativa (-1 a -3°C) essas médias são maiores quando comparado aos materiais que foram vernalizados na faixa de temperatura positiva (2 a 4°C). O mesmo padrão de comportamento é observado para ambas as cultivares.

Com relação a redução das características desejáveis desses órgãos de reserva relacionadas a termoterapia, possivelmente se deve ao fato de que ao aplicar essa relação temperatura-tempo, de fato o material propagativo apresenta redução ou até mesmo eliminação do patógeno, mas a medida que a relação avança, seja em aumento da temperatura ou quantidades de dias que esse material é exposto, inevitavelmente irão ocorrer efeitos deletérios no hospedeiro, principalmente com relação a sua capacidade regenerativa. Argumenta Ghini; Bettiol (1995) que o mecanismo de ação da temperatura é complexo, tanto no controle dos patógenos quanto na injúria do hospedeiro, podendo envolver um ou vários fatores, como a desnaturação de proteínas, destruição de hormônios, injúria metabólica e aptidão das plantas em se recuperar dos danos causados pelo tratamento, entre outros.

Algo importante de se relatar sobre o presente estudo, é que ciclo das plântulas quando submetidas a vernalização em temperaturas positivas apresentaram em média, cerca de 20 a 25 dias de redução do ciclo quando comparadas com as plântulas submetidas a vernalização em temperaturas negativas, para os mesmos tratamentos de quantidade de dias de termoterapia. Nesse sentido, Mann (1952) observou que bulbilhos armazenados à temperatura de 5 a 15°C produziram plantas com crescimento inicial mais rápido e que para algumas épocas de plantio, o armazenamento à temperatura de 0 a 5 °C pode acelerar a senescência da planta. Aoba; Takagi (1971) verificaram que plantas provenientes de bulbilhos refrigerados à temperatura de 5 a 15 °C por 20 a 30 dias, apresentavam bulbificação antecipada, sendo tanto maior o efeito quanto menor a temperatura e maior o tempo de tratamento. Com relação as faixas de temperatura de vernalização negativa, os resultados estão em conformidade com estudos recentes, onde Azevedo (2019) observou que a utilização de temperaturas negativas para vernalização do alho resultou em um desenvolvimento inicial mais lento das plantas, quando comparado à vernalização tradicional (temperaturas positivas). O estudo supracitado ainda relata que na fase final

de desenvolvimento do bulbo ocorreu o alongamento do ciclo e conseqüentemente maior desenvolvimento e enchimento dos bulbos

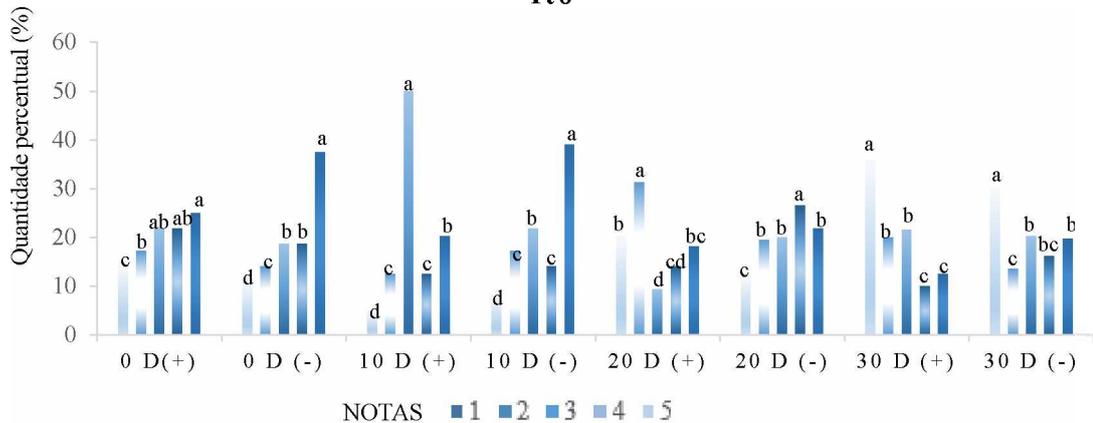
TABELA-4: Efeito da combinação de diferentes temperaturas de vernalização (2 a 4 °C) e (-1 a -3 °C) X dias de termoterapia (0, 10, 20,30 dias) sob as variáveis: porcentagem de plantas com formação de bulbos, número de bulbos por planta (NBP), diâmetro de bulbo (DB), massa fresca de bulbo (MFB), de plântulas *in vitro* de alho (*Allium sativum*) das cultivares Ito e Quitéria - Cristalina-GO, 2021.

Temperatura de vernalização X dias de termoterapia	% bulbificação		NBP		DB (mm)		MFB (g)	
	Ito	Quitéria	Ito	Quitéria	Ito	Quitéria	Ito	Quitéria
0 dias (+)	100	100	3.93	3.94 - a	4.12 - ab	5.04- ab.	0.39 - a	0.44 - a
0 dias (-)	100	100	4.43	3.55- ab	4.22 - a	5.28 - a	0.38 - a	0.38 - a
10 dias (+)	100	100	4.47	3.53- ab	3.84 - abc	4.69- abc	0.25 - ab	0.36 - ab
10 dias (-)	100	100	4.25	3.17- ab	3.83 - abc	5.18 - ab	0.35 - a	0.37 - ab
20 dias (+)	100	87	3.87	2.93- ab	3.73 - abcd	4.49 - bc	0.28 - ab	0.17- bc
20 dias (-)	100	93	4.28	2.58- ab	3.54 - bcd	4.57 - bc	0.32 - ab	0.20 - bc
30 dias (+)	75	70	2.31	2.42- b	3.26 - d	4.37 - c	0.19 - c	0.18- c
30 dias (-)	85	75	2.40	2.50- ab	3.48 - cd	4.48 - bc	0.15 -d	0.28 -b
P-valor			3.60×10^{-1}	3.12×10^{-2}	2.17×10^{-2}	2.04×10^{-2}	5.09×10^{-4}	$< 0.00^3$
CV (%)			43.26	39.55	14.21	13.67	50.02	53.67

^{ns)} não significativo ¹⁾Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro

Ao analisar os dados relacionados ao grau de hiperhidricidade, nota-se que, quando os bulbilhos foram vernalizados em temperatura negativa (-1 a -3 °C), apresentaram um maior percentual médio de microbulbos com notas 4 e 5, quando comparados aos bulbilhos que foram vernalizados em temperatura positiva (2 a 4 °C) para os mesmos tratamentos de quantidade de dias de termoterapia, tanto para cultivar Ito quanto para Quitéria, conforme pode ser observado nas Figuras 8 e 9.

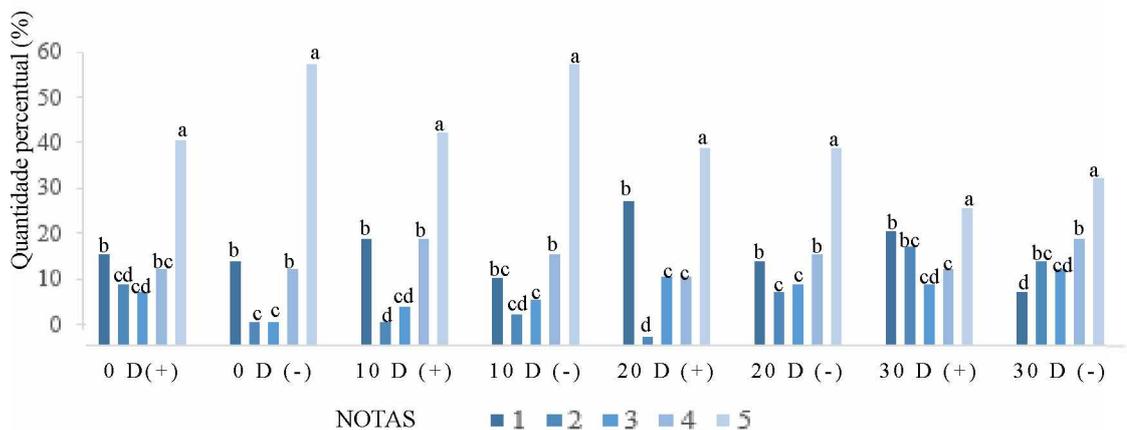
Escala de Hiperhidricidade Vernalização x Termoterapia Ito



Médias seguidas de mesma letra minúscula dentro de cada tratamento não se diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade

FIGURA-8: Valores percentuais médios, das notas atribuídas de acordo com o grau de hiperhidricidade aos microbulbos advindos das plântulas *in vitro* de alho (*Allium sativum*) cultivar Ito, submetida a diferentes temperaturas de vernalização X dias de termoterapia – Cristalina-GO, 2021.

Escala de Hiperhidricidade Vernalização x Termoterapia Quitéria



Médias seguidas de mesma letra minúscula dentro de cada tratamento não se diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade

FIGURA-9: Valores percentuais médios, das notas atribuídas de acordo com o grau de hiperhidricidade aos microbulbos advindos das plântulas *in vitro* de alho (*Allium sativum*) cultivar Ito, submetida a diferentes temperaturas de vernalização X dias de termoterapia -Cristalina-GO, 2021.

Contudo, deve-se levar em conta que somente esses números não bastam na tomada de decisão para saber qual a melhor relação Temperatura de vernalização X dias de termoterapia, por isso foi realizada indexação viral para os seguintes vírus “Onion yellow dwarf virus garlic strain” (OYDV-G) e o “Leek yellow stripe vírus” (LYSV) e para o “Garlic common latent vírus” (GarCLV). Utilizando o Dot-Blot (DB), o teste sorológico baseada no ELISA. Os resultados estão descritos a seguir na Tabela 5.

TABELA-5: Resultados da indexação viral para Onion yellow dwarf virus garlic strain” (OYDV-G) e o “Leek yellow stripe vírus” (LYSV) e para o “Garlic common latent vírus” (GarCLV). Utilizando o Dot-Blot (DB), de plântulas *in vitro* de alho (*Allium sativum*) das cultivares Ito e Quitéria submetidas a diferentes temperaturas de vernalização (2 a 4 °C) e (-1 a -3 °C) X dias de termoterapia (0, 10, 20,30 dias) - Cristalina-GO, 2021.

Temperatura de vernalização X dias de termoterapia	Porcentagem de incidência viral (%)					
	GCLV		LYSV		OYDV	
	Ito	Quitéria	Ito	Quitéria	Ito	Quitéria
0 dias (+)	20	23	60	56	40	53.
0 dias (-)	17	16	40	50	35	22
10 dias (+)	0	0	35	10	55	21
10 dias (-)	0	0	22	0	47	19
20 dias (+)	6	0	15	0	6	5
20 dias (-)	0	0	2	0	0	3
30 dias (+)	0	0	0	0	8	10
30 dias (-)	0	0	0	0	3	5

Os resultados expostos evidenciam que na temperatura utilizada de 37 °C, o tempo mínimo necessário é de 20 dias de termoterapia em câmara de aquecimento, quando os bulbilhos foram vernalizados à temperatura negativa, para que de fato a termoterapia possa ser associada com o cultivo *in vitro* e, assim, auxiliar na redução do “pool” de viroses, diminuindo ainda mais os efeitos deletérios sobre a produtividade da cultura. Portanto, supõe-se que esses bulbilhos vernalizados em temperaturas negativas apresentaram menor carga viral devido ao fato de que quanto menores forem as

temperaturas de vernalização, menor será a taxa respiratória e o desenvolvimento desses tecidos vegetais, sendo assim supõem-se que essa diminuição no desenvolvimento impacta diretamente na replicação de partículas virais (TORRES et al., 2000; SOUZA et al., 2002; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Constatou-se durante a realização deste trabalho uma relação da viabilidade e sanidade dos bulbilhos doadores de meristemas com as distintas faixas de temperaturas de vernalização. Esse fato é importante, pois define o sucesso das etapas posteriores, uma vez que quanto maior a qualidade e sanidade do material de origem, menos perdas por contaminações haverá nas etapas subsequentes.

Os dados (figuras 10 e 11) evidenciam que quanto maior o tempo de vernalização, menor é o percentual de bulbilhos que permanecem viáveis, no entanto, essa perda é maior quando esse material foi vernalizado em temperaturas positivas, uma vez que quanto menores forem as temperaturas as quais esses materiais serão armazenados durante a vernalização, menor será a taxa metabólica e desenvolvimento dos microrganismos presentes em sua superfície. Logo, temperaturas de vernalização menores resultaram em reações químicas e atividade enzimática de degradação mais lentas, bem como diminuição de perdas por crescimento microbiano dos fungos e bactérias nos bulbilhos.

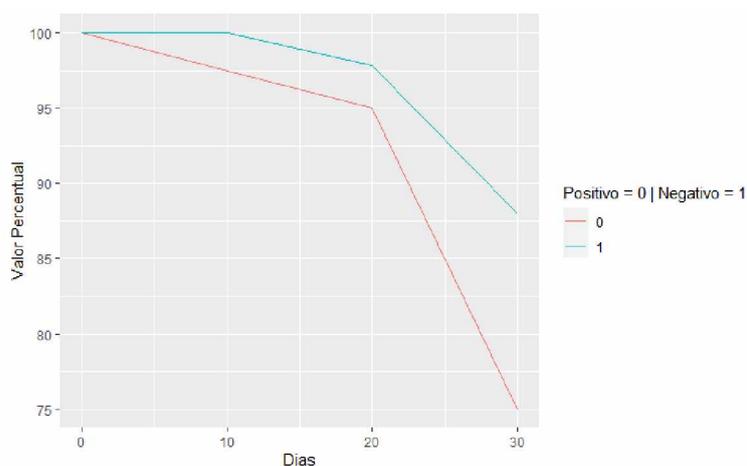


FIGURA-10: Valores percentuais médios, da quantidade de bulbilhos de *Allium sativum*, cultivar Ito doadores de meristema viáveis submetidos a diferentes faixas de temperaturas de vernalização ao longo dos dias de termoterapia a 37 °C – Cristalina-GO, 2021

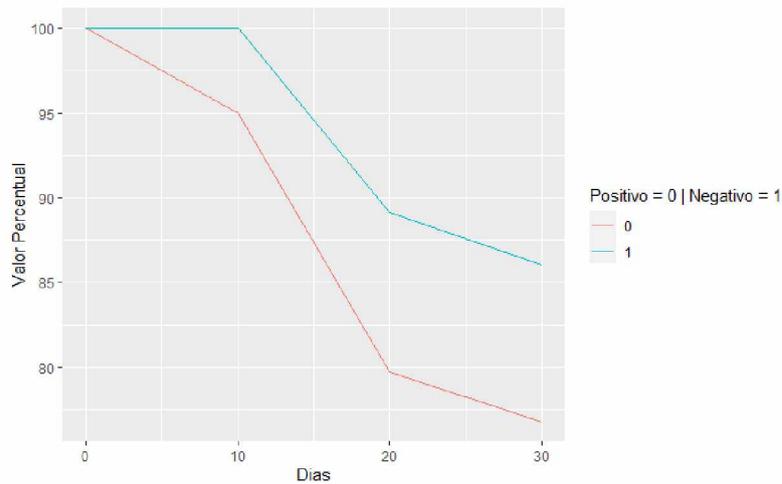


FIGURA-11: Valores percentuais médios, da quantidade de bulbilhos de *Allium sativum*, cultivar Ito doadores de meristema viáveis submetidos a diferentes faixas de temperaturas de vernalização ao longo dos dias de termoterapia a 37 °C – Cristalina-GO,2021.

Os resultados estão em conformidade com a literatura. Lino (2014) descreve que, entre -1,5° C a 10°C, não há eliminação de microrganismos, porém ocorre a inibição de seu ciclo de reprodução e, conseqüentemente, o retardo na deterioração desses materiais quando acometidos por microrganismos, impedindo assim que, de certa forma, eles se desenvolvam, o que prolonga um pouco mais a vida útil desses bulbilhos quando armazenados em baixas temperaturas durante sua vernalização.

5. CONCLUSÃO

O protocolo para obtenção *in vitro* de alho livre de vírus desenvolvido para as cultivares de alho Caçador e Amarante descrito por TORRES e colaboradores (2001) foi adaptado e otimizado para as cultivares de alho nobre Ito e Quitéria, uma vez que: os LEDs azuis proporcionaram resultados superiores para todos os parâmetros analisados para ambas as cultivares, com exceção da característica DB.

O microambiente contendo troca gasosa, utilizando potes englobando tampas com um filtro, reduziu de maneira significativa o grau de hiperhidricidade dos microbulbos formados para ambas as cultivares. O uso de sacarose, concentração de 8%, na fase de bulbificação aumentou as características produtivas, ao passo que não causou prejuízo

com relação ao grau de hiperhidricidade dos microbulbos obtidos tanto para cultivar Ito quanto para Quitéria.

Na faixa de temperatura de vernalização negativa (-1 a -3°C), as médias de produtividade dos microbulbos foram maiores que os vernalizados em temperatura positiva (2 a 4°C) para ambas as cultivares. Enquanto na indexação viral, a 37 °C o tempo mínimo necessário foi 20 dias de termoterapia em câmara de aquecimento, quando os bulbilhos foram vernalizados à temperatura negativo para auxiliar na redução do “pool” de viroses.

Para materiais doadores de meristema, quanto maior o tempo de exposição dos bulbilhos à termoterapia, menor o percentual de materiais que permanecem viáveis, os efeitos deletérios foram sentidos com maior intensidade nos bulbilhos vernalizados em temperaturas positivas.

6. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, S. M. Z. *et al.* Alterações morfológicas e alocação de biomassa em plantas jovens de espécies florestais sob diferentes condições de sombreamento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 1, p. 62- 68, jan./fev, 2005.

ANDRADE, S. R. M de. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002. 16 p.

AOBA, T.; TAKAGI, H. Studies on the bulb formation in garlic plants III. On the effects of cooling treatments of seed-bulbs and day-length during the growing period on bulbing. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, Quioto, v. 40, n. 3, p. 240-245, 1971.

ARAGÓN, C. *et al.* *Ex vitro* acclimatization of plantain plantlets micropropagated in temporary immersion bioreactor. **Biologia Plantarum**, Londres, v. 54, p. 237-244, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10535-010-0042-y>. Acesso em: 22 jun 2022.

AZEVEDO, B. N. R. de. **Produtividade e qualidade de alho nobre sob temperatura negativa de vernalização**. 2019. 30 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

BACH, A.; PAWLOWSKA, B.; PULCZYNSKA, K. Utilization of soluble carbohydrates in shoot and bulb regeneration of *Hyacinthus orientalis* L. in vitro. **Acta Horticulturae**, v. 325, n. 67, p. 487–491, 1992. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1992.325.67>.

BAI, Y. *et al.* Advances in research of garlic virus diseases. **Journal of Northeast Agricultural University**, China, v. 17, n. 2, p. 85- 92, 2010.

BANDINELLI, M. G. *et al.* 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. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-05362013000200011>. Acesso em: 24 fev. 2022.

BARROCAS, E. N. *et al.* Uso de técnicas moleculares para diagnose de patógenos em sementes. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 253, p. 24-32, nov./dez., 2009.

BERTONI, B.W. *et al.* Micropropagação de *Calendula officinalis* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 2, p. 48-54, 2006.

BUFFA FILHO, W. *et al.* Indução de Metabólitos Bioativos em Culturas de Células de *Maytenus ilicifolia*. **Eclética Química**, Araraquara, v. 27, n. 1, p. 1-12, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-46702002000200033>. Acesso em: 22 jun 2022.

CAFRUNE, E. E.; PEROTTO, M. C.; CONCI, V. C. Effect of two *Allexivirus* isolates on garlic yield. **Plant disease**, St. Paul, v. 90, n. 7, p. 898-904, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-90-0898>. Acesso em: 22 fev. 2022.

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

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. *In*: CID, L. P. B. **Cultivo *in vitro* de plantas**. 3. ed. Brasília: Embrapa, 2014. p. 17-45.

CLARCK, M. F.; ADAMS, A. N. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, v. 34, n. 3, p. 475-483, 1977. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-34-3-475>. Acesso em: 25 mar. 2022.

COMPANHIA BRASILEIRA DE ABASTECIMENTO- CONAB. Alho: análise mensal de setembro de 2021. Brasília, DF: CONAB, 2021. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-alho>. Acesso em: 20 abr. 2022.

CONAB – Companhia Brasileira de Abastecimento. Alho: análise mensal de março de 2022. **CONAB – Companhia Brasileira de Abastecimento**. Brasília, DF: CONAB, 2022. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-alho/item/17954-alho-analise-mensal-marco-2022>. Acesso em: 02 maio 2022.

CRISTINA, T. Tecnologias da Embrapa impulsionam crescimento da produção de alho no Brasil. **ANAPA – Associação Brasileira de Produtores de Alho**. Brasília, DF: ANAPA, 2021. Disponível em: <http://anapa.com.br/tecnologias-da-embrapa-impulsionam-crescimento-da-producao-de-alho-no-brasil/>. Acesso em: 01 maio 2022.

DEBERGH, P.; HARBAOUI, Y.; LEMEURE, R. Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with

special reference to water potential. **Physiologia Plantarum**, Lund, n. 53, p. 181-187, 1981. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1981.tb04130.x>.

DUSI, A. N.; FAJARDO, T. V. M.; CUPERTINO, F. P. Serological identification of garlic (*Allium sativum*, L.) virus in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, p. 298-298, 1994.

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

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. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000400039>.

FAJARDO, T. V. M. *et al.* Garlic viral complex: identification of *Potyvirus* and *Carlavirus* in central Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 3, p. 619-626, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582001000300007>. Acesso em: 15 fev. 2022.

FAYAD-ANDRÉ, M. S. **Diagnose, disseminação e efeitos fisiológicos do complexo viral do alho em regiões produtoras do Brasil**. 2010. 173 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

FERNANDES, L. J. C. *et al.* Resposta de plantas de alho livres de vírus ao nitrogênio em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 97-101, jan./mar., 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-05362010000100018>. Acesso em: 15 mar. 2022.

FERNANDES, D. A. *et al.* 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. DOI: <https://doi.org/10.37856/bja.v88i3.114>. Acesso em: 25 maio 2022.

FILGUEIRA, F. A. R. dos. **Novo manual de Olericultura**: Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3.ed. Viçosa: Editora UFV, 2008. 421 p.

FONTES, M. A. **Morfogênese *in vitro*, isolamento e cultivo de protoplastos e transformação genética de pimentão (*Capsicum* sp.)**. 1998. 167 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

FONTES, M. A. *et al.* Hyperhydricity in pepper plants regenerated *in vitro*: involvement of BiP (Binding Protein) and ultrastructural aspects. **Plant Cell Reports**, New York, v. 19, n. 1, p. 81- 87, 1999. DOI: 10.1007/s002990050714. Acesso em: 12 jul. 2022.

FRANCK, T. *et al.* Hyperhydricity: a special defense strategy against *in vitro* culture stress conditions? **Archives of Physiology and Biochemistry**, Lisse, v. 106, n. 1, p. 71-71, 1998.

GAO, S. *et al.* Photosynthetic characteristics and chloroplast ultrastructure of welsh onion (*Allium fistulosum* L.) grown under different LED wavelengths. **BMC Plant**

Biology, Londres, v. 78, p. 1-30, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12870-020-2282-0>. Acesso em: 15 mar. 2022.

GASPER, T. *et al.* When plant teratomas turn into cancers in the absence of pathogens. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 83, n.4, p. 96-701, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb02489.x>. Acesso em: 15 mar. 2022.

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

GOINS, G. D. *et al.* Photomorphogenesis, photosynthesis, and seed yield of wheat plants grown under red light-emitting diodes (LEDs) with and without supplemental blue lighting. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, n. 7, p. 1407-1413, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/48.7.1407>.

GRIS, T. *et al.* Light quality and sealing type affect in vitro growth and development of *Capsicum frutescens* cultivars. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 3, p. 1-15, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120190061>.

HAN, Y-J.; SONG, P-S.; KIM, J-I. Phytochrome-Mediated Photomorphogenesis in Plants. **Journal of Plant Biology**, v. 50, n. 3, p. 230-240, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF03030650>.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 108, n. 2, p. 105-120, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.038>.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. Produção de alho. 2020. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/alho/br>. Acesso em: 02 abr. 2022.

IVANOVA, M.; STADEN, J. V. Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schonland ex Pillans. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 60, p. 143-150, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10725-009-9430-8>. Acesso em: 05 jul. 2022.

KELLER, E. R. J. Sucrose, cytokinin, and ethylene influence formation of *in vitro* bulblets in onion and leek. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Alemanha, v. 40, n. 2, p. 113-120, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00052642>. Acesso em: 13 jun. 2022.

KEVERS, C. *et al.* Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 61, p. 69-74, 1984. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1984.tb06102.x>. Acesso em: 13 fev. 2022.

KOZAI, T.; NGUYEN, Q. T. Photoautotrophic micropropagation of Wood and tropical plants. *In*: JAIN, S. M.; ISHII, K. **Micropopagation of wood trees and fruits**.

Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 757-781. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-010-0125-0_26. Acesso em: 13 fev. 2022.

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. DOI: <https://doi.org/10.1007/1-4020-3126-2>.

KRITZMAN, A.; RACCAH, B.; GERA, A. Transmission of iris yellow spot tospovirus. MARULLO, R.; CANBERRA, M. L. (ed). **Thrips and tospoviruses**: proceedings of the 7th International Symposium on Thysanoptera. Canberra: Australian National Insect Collection CSIRO, 2001. p. 95-98.

LAMEIRA, O. A. *et al.* **Cultura de tecidos (manual)**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 41 p.

LAZZARINI, L. E. S. *et al.* Uso de diodos emissores de luz (LED) na fisiologia de plantas cultivadas: revisão. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v. 16, n. 2, p. 137-144, abr./jun., 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.18188/1983-1471/sap.v16n1p137-144>. Acesso em: 17 fev. 2022.

LINO, G.C.L.; LINO, T.H.L. **Congelamento e refrigeração**. Londrina: UTFPR, 2014

LIU, M. *et al.* Evaluation of leaf morphology, structure and biochemical substance of balloon flower (*Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.) plantlets *in vitro* under different light spectra. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 174, n. 1, p. 112-118, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.05.006>.

LONGO, A. E. de O. e. *et al.* Micropropagação e bulbificação *in vitro* de alho (*Allium sativum* L.). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 8, n. 1-2, p. 18-26, 2012.

LUCENA, R. R. M. de. *et al.* Qualitative analysis of vernalized semi-noble garlic cultivars in western Rio Grande do Norte State, Brazil. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 29, n. 3, p.764-773, 2016.

MAGYAR-TÁBORI, K. Phytotoxicity and other adverse effects on the *in vitro* shoot cultures caused by virus elimination treatments: reasons and solutions. **Plants**, v. 10, n. 4, p. 1-62, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10040670>. Acesso em: 23 mar. 2022.

MANN, L. K. Anatomy of the garlic bulb and factors affecting bulb development. **Hilgardia**, Berkeley, v. 21, n. 8, p. 195-249, 1952. DOI: <https://doi.org/10.3733/hilg.v21n08p195>. Acesso em: 23 mar. 2022.

MAROUELLI, W. A.; LUCINI, M. A. Manejo de irrigação na cultura do alho. **Revista Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 26, n. 3, p. 46-49, nov.2013/fev.2014.

MILLS, D.; YANQING, Z.; BENZIONI, A. Effect of substrate, medium composition, irradiance and ventilation on jojoba plantlets at the rooting stage of micropropagation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 121, n. 1, p. 113-118, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.01.021>. Acesso em: 25 jun. 2022.

MOHAMED-YASSEEN, Y.; SPLITTSTOESSER, W. E.; LITZ, R. E. In vitro shoot proliferation and production of sets from garlic and shallot. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 36, p. 243-247, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00037726>.

MOTA, J. H. *et al.* Diversidade genética de cultivares de alho (*Allium sativum* L.) por meio de marcador molecular RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 764-770, jul./ago., 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542004000400006>.

MOTA, J. H. *et al.* Similaridade genética de cultivares de alho pela comparação de caracteres morfológicos, físico-químicos, produtivos e moleculares. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 156-160, abr./jun., 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-05362006000200006>. Acesso em: 23 mar 2022.

MUNEER, S. *et al.* Influence of green, red and blue light emitting diodes on multiprotein complex proteins and photosynthetic activity under different light intensities in lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.). **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 15, n. 3, p. 4657-4670, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3390%2Fijms15034657>.

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. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>. Acesso em: 22 jun 2022.

NAGAKUBO, T.; NAGASAWA, A.; OHKAWA, H. Micropropagation of garlic through *in vitro* bulblet formation. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 32, p. 175-183, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00029840>. Acesso em: 22 jun 2022.

NARDINI, J. P. C. **Vernalização, adubação e densidade de plantio na qualidade e produção de alho-semente no Cerrado**. 2021. 89 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Botucatu, Botucatu, 2021.

OLMOS, E.; HELLÍN, E. Ultrastructural differences of hyperhydric and normal leaves from regenerated carnation plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 75, n. 1-2, p. 91-101, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(98\)00096-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(98)00096-X). Acesso em: 24 jun 2022.

PALMA, D. *et al.* Aspectos morfofisiológicos e controle da hiperhidricidade na cultura de tecidos vegetais. **Current Agricultural Science and Technology**, Pelotas, v. 17, n. 2-4, p. 174-184, abr./jun., 2011.

PARK, S. W. *et al.* Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 99, n. 2, p. 199-205, 2004. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(03\)00097-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(03)00097-9). Acesso em: 22 jun 2022.

PARK, S. Y. *et al.* 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. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10535-011-0125-4>. Acesso em: 12 jul 2022.

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos**: meios de cultura. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127 p.

QUOIRIN, M. G. G. *et al.* Micropropagação de *Gypsophila* pela cultura de segmentos nodais. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 1, p. 79-83, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/rsa.v9i1.10140>. Acesso em: 15 fev. 2022.

RADMANN, E. B. *et al.* Influência da densidade de fluxo luminoso na qualidade de plantas micropropagadas de *Gypsophila paniculata* L. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 7, n. 3, p. 171-175, set./dez., 2001.

RAVNIKAR, M. *et al.* Jasmonic acid stimulates shoots and bulb formation of garlic *in vitro*. **Journal of Plant Growth Regulation**, Estados Unidos, v. 12, n. 2, p. 73-77, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00193236>. Acesso em: 12 jun. 2022.

RESENDE, G. M. de; CHAGAS, S. J. de R.; PEREIRA, L. V. Características produtivas e qualitativas de cultivares de alho. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 4, p. 686-689, out./dez., 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-05362003000400023>. Acesso em: 12 jun. 2022.

RESENDE, F. V. *et al.* Como plantar alho. Brasília, DF: EMBRAPA, 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/hortalicas/alho/clima>. Acesso: 08 mar. 2022.

RESENDE, F. V. Desafios da produção e inovações tecnológicas para cultura do alho no Brasil. **Hortalicas em Revista**, Brasília/Anápolis, v. 7, n. 25, p. 16-17, maio/ago., 2018. Disponível: <https://www.embrapa.br/hortalicas/hortalicas-em-revista>. Acesso em: 20 mar. 2022.

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**. Brasília: Embrapa Hortalicas, 2018. 26 p.

REUTHER, G. Stimulation of the photoautotrophy of *in vitro* plants. *In*: INTERNATIONAL HORTICULTURAL CONGRESS, 23, 1990, Firenze. **Anais[...]**. Firenze: Advances in Horticultural Science, 1990, s/p. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/i40109800>. Acesso em: 01 fev. 2022.

ROCHA, H. S. Biofábricas: estruturas físicas e organização. *In*: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. (ed.). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2009. p. 121-152.

SÆBØ, A.; KREKLING, I. T.; APPELGREN, M. Light quality affects photosynthesis and leaf anatomy of birch plantlets *in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 41, n. 2, p. 177-185, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00051588>. Acesso em: 07 maio 2022.

SALOMON, R. Virus Diseases in Garlic and the propagation of virus-free plants. *In*: Rabinowitch, H. D.; Currah, L. (ed.) **Allium Crop Science: recent Advances**. New York: CABI, 2002. p. 311-327.

SANTOS, A. P. **Influência da troca gasosa e concentrações de sacarose na fase de bulbificação in vitro de *Allium sativum* L.** 2021. Trabalho de conclusão de curso – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2021.

SCOTTON, D. C. **Otimização do cultivo in vitro visando a transformação genética das cultivares brasileiras de alho (*Allium sativum* L.).** 2007. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

SNJEŽANA, K. *et al.* Production of virus-free garlic plants through somatic embryogenesis. **Agronomy**, v. 11, n. 5, p. 1-13, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy11050876>. Acesso em: 15 fev. 2022.

STAIKIDOU, I. *et al.* *Narcissus* bulblet formation in vitro: effects of carbohydrate type and osmolarity of the culture medium. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v. 80, p. 313-320, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-004-1366-0>. Acesso em: 09 mar. 2022.

STEFANEL, C. M. *et al.* Diodos emissores de luz (LEDs) no cultivo in vitro de *Eugenia involucrata*. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 40, p. 1-5, 2020. DOI: <https://doi.org/10.4336/2020.pfb.40e201901930>. Acesso em: 08 abr. 2022.

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

TORRES, A. C. *et al.* 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. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-05362000000300010>. Acesso em: 05 fev. 2022.

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CBAB, 1998. 509 p.

TORRES, A. C. *et al.* **Produção de alho-semente com alta qualidade fitossanitária mediante cultura de ápices caulinares**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2001. 8p. (Circular Técnica, 27).

TRIPATHY, B. C.; BROWN, C. S. Root-shoot interaction in the greening of wheat seedlings grown under red light. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 107, n. 2, p. 407-411, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.107.2.407>.

VIEIRA, R. L. **Aspectos fisiológicos e fitossanitários na micropropagação para a obtenção de alho-semente livre de vírus**. 2012. 193 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

WANG, M-R. *et al.* Combining thermotherapy with meristem culture for improved eradication of onion yellow dwarf virus and shallot latent virus from infected in vitro-cultured shallot shoots. **Annals of applied Biology**, v. 178, n. 3, p. 442-449, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/aab.12646>.

WOJTANIA, A.; WĘGRZYNOWICZ-LESIAK, E. Ethylene and cytokinin interaction in the morphogenesis of *Pelargonium x hortorum* L.H. Bailey in vitro. **Acta Physiologiae**

Plantarum, Poznan, v. 34, n. 6, p. 2407-2412, 2012. DOI:
<https://doi.org/10.1007/s11738-012-1005-z>.

ŽEL, J. *et al.* The effect of jasmonic acid, sucrose and darkness on garlic (*Allium sativum* L. cv. Ptujski Jesenski) bulb formation *in vitro*. ***In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant***, Raleigh, v. 33, p. 231-235, jul./set., 1997. DOI:
<https://doi.org/10.1007/s11627-997-0028-4>.

ZIV, M. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. *In*: DEBERGH, P. C.; ZIMMERMAN, R. H. (ed.). **Micropropagation: Technology and Application**. Dordrecht: Kluwer Academic Press, 1991. p. 45-69.