

Indução e desenvolvimento de bulbos de alho *in vitro* por meio da vernalização de bulbilhos e da variação do fotoperíodo

Renato Luis Vieira¹, Aparecido Lima da Silva², Gilmar Roberto Zaffari³, Anderson Luiz Feltrim⁴ e

Anderson Fernando Wamser⁵

Resumo – A morfogênese de plantas de alho (*Allium sativum* L.) *in vitro* é controlada por substâncias adicionadas ao meio de cultivo e por fatores ambientais. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da vernalização de bulbilhos e do fotoperíodo no processo de indução de bulbos de alho *in vitro*. Meristemas caulinares foram excisados de bulbilhos vernalizados por períodos de zero, 30, 60 e 90 dias e submetidos ao cultivo *in vitro* sob condições de fotoperíodo curto (11h) ou longo (16h). Independentemente do fotoperíodo a que foram expostas, as plantas micropropagadas a partir de meristemas extraídos de bulbilhos vernalizados por 30 a 60 dias apresentaram 100% de taxa de bulbificação. Detectou-se interação entre fotoperíodo e temperatura apenas para massa fresca de bulbo e para altura de plantas, indicando, portanto, que há dependência entre esses fatores ambientais na micropropagação do alho. O tempo de exposição das plantas ao frio reduz a sensibilidade ao fotoperíodo para a indução da bulbificação. As plantas de alho cultivadas *in vitro* apresentam respostas morfogenéticas positivas para a indução e o desenvolvimento de bulbos do tipo dependente de termofotoperíodo.

Termos para indexação: micropropagação, meristema, bulbificação, *Allium sativum*.

In vitro garlic bulbs induction and development by bulbils vernalization and photoperiodic variation

Abstract – In vitro morphogenesis of garlic plants (*Allium sativum* L.) is controlled by substances added to culture media and by environmental factors. The objective of this study was to assess the effects of vernalization of bulbils and of photoperiod on the process of in vitro induction of garlic bulbs. Shoot meristems were excised from bulbils vernalized for periods of 0, 30, 60 and 90 days and cultivated in vitro either under conditions of short photoperiod (11h) or long photoperiod (16h). Regardless of the photoperiod they were exposed to, plants micropropagated from meristems extracted from those bulbils vernalized for 30 or 60 days showed a rate of bulbing of 100%. Interaction between photoperiod and temperature was detected only in bulb fresh weight and plant height, thus showing the dependence between these environmental factors in the micropropagation of garlic. The time of exposure of plants to cold decreases the sensitivity to photoperiod for bulbing induction. Garlic plants grown *in vitro* present morphogenetic answers to the induction and development of thermo and photoperiod-dependent bulbils.

Index terms: micropropagation, meristem, bulbing, *Allium sativum*.

Introdução

O processo de bulbificação de alho (*Allium sativum* L.) é controlado por fatores ambientais, principalmente fotoperíodo e temperatura, os quais regulam os níveis endógenos de substâncias de crescimento. Temperatura baixa no início do processo seguida de dias longos têm sido relatados como favoráveis à bulbificação, enquanto dias curtos com temperaturas elevadas retardam

ou inibem esse processo (Menezes Sobrinho, 1997). Em ambiente de cultivo *in vitro*, a temperatura e a luz desempenham um papel fundamental, influenciando muitas respostas das plantas cultivadas, sendo indutores naturais da morfogênese e do crescimento de plantas (Figueiredo-Ribeiro et al., 2004). Esses fatores regulam não só as taxas de crescimento, mas também a transição entre diversas fases vegetativas e reprodutivas do desenvolvimento das plantas

(Ascough et al., 2008).

De um modo geral, as exigências climáticas de plantas de alho em cultivos *in vitro*, principalmente temperatura, seguem o mesmo padrão de exigência das plantas cultivadas *in vivo*. Contudo, a temperatura e o regime de luz utilizados na maioria dos laboratórios de cultura de tecidos de plantas são padronizados em função de trabalhos com variado número de espécies, normalmente abrangendo temperatura de 25 ± 1°C ▶

Recebido em 8/2/2013. Aceito para publicação em 23/7/2013.

¹ Engenheiro-agrônomo, Dr., Epagri/ Estação Experimental de Caçador, C.P. 591, 89500-000 Caçador, SC, fone: (49) 3561-2019, e-mail: revieira@epagri.sc.gov.br.

² Engenheiro-agrônomo, Dr., Universidade Federal de Santa Catarina, C.P. 476, 88040-900 Florianópolis, SC, fone: (48) 9619-3405, e-mail: alsilva@cca.ufsc.br.

³ Engenheiro-agrônomo, Dr., Epagri/ Estação Experimental de Itajaí, C.P. 277, 88318-112 Itajaí, SC, fone: (47) 3341-5244, e-mail: gzaffari@epagri.sc.gov.br.

⁴ Engenheiro-agrônomo, M.Sc., Epagri/ Estação Experimental de Caçador, fone: (49) 3561-2000.

⁵ Engenheiro-agrônomo, M.Sc., Epagri/ Estação Experimental de Caçador, fone: (49) 3561-2000.

e fotoperíodo de 16 horas. Dessa forma, para que ocorra o desenvolvimento de plantas de alho nessa condição ambiental, é imperativo que se faça a vernalização dos bulbilhos fornecedores de meristemas para estimular a bulbificação.

Entre os primeiros trabalhos que citam o uso da vernalização de bulbilhos de alho no pré-plantio *in vivo*, Ferreira et al. (1986) e Biasi & Mueller (1999) constataram que bulbilhos armazenados sob temperatura de 5 a 10°C produziram plantas com crescimento inicial mais rápido, bulbificação antecipada e produção de maior número de bulbos. Nos sistemas de micropropagação do alho, essas respostas podem ser relevantes, visto que a baixa taxa de multiplicação dos explantes, o tamanho e o peso reduzido do bulbo produzido estão entre os fatores mais limitantes.

Outro importante aspecto da bulbificação diz respeito à taxa de crescimento e formação do bulbo em plantas de alho. Nos sistemas de cultivo de espécies bulbosas, a formação do bulbo é expressa pela razão bulbar (RB), ou seja, quanto menor for essa razão, melhor será a conformação do bulbo. Alguns autores consideram o valor de razão bulbar de 0,5 como referência para indicar o início do processo de bulbificação, tal como os relatados para obtenção de bulbos de cebola (Tsfay et al., 2011) e em alho (Burba, 1983). Segundo Brewster (2008), a relação bulbar inferior a 0,5 indica intensificação na formação do bulbo e valores inferiores a 0,2 indicam final da bulbificação.

A indução de bulbos *in vitro* tem sido amplamente descrita com sucesso, principalmente para espécies do gênero *Allium*. Os protocolos de micropropagação de alho, atualmente utilizados para obter plantas livres de vírus, devem permitir o crescimento e a subsequente bulbificação *in vitro*, por meio de formação de estruturas de reserva na base. Desse modo, a microbulbificação *in vitro* constitui um avanço tecnológico importante na micropropagação do alho, além de ser útil em programas de intercâmbio de germoplasma. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do período de vernalização de bulbilhos doadores de meristemas e do fotoperíodo no processo de indução de

bulbos de alho *in vitro*.

Material e métodos

Bulbilhos de alho (*Allium sativum* L.) do cultivar Jonas, provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de alho da Epagri, foram utilizados para a extração dos meristemas. O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Epagri/ Estação Experimental de Caçador, SC, no período entre 30/6/2011 e 15/12/2011.

Bulbilhos vernalizados por diferentes períodos em câmara frigorífica a 4°C foram desinfetados em álcool 70% por um 1 minuto e hipoclorito de sódio 1,5% por 20 minutos, seguido de tríplice lavagem em água destilada autoclavada.

Em câmara de fluxo laminar, meristemas com até dois primórdios foliares foram excisados e submetidos a duas fases de cultivo *in vitro*: a primeira para o desenvolvimento inicial da planta (fase de iniciação), em meio de cultura com base na formulação salina MS (Murashige & Skoog, 1962), com redução de dois terços da concentração salina (MS/3), adicionando-se vitaminas (tiamina, piridoxina, glicina e ácido nicotínico), mio-inositol (100mg/L) e 6-benzilaminopurina (0,1mg/L); na segunda fase, para o enraizamento das plantas e a indução de bulbos (fase de bulbificação), as plantas foram transferidas para meio MS, adicionado de vitaminas, mio-inositol (100mg/L) e ácido naftalenoacético (0,2mg/L). Em ambos os meios de cultura foram adicionados sacarose (3%) e ágar (0,6%) e o pH foi ajustado para 5,9 antes da autoclavagem a 1,5atm por 15 minutos.

As culturas foram mantidas sob condições de fotoperíodo curto (11h) ou longo (16h), ambos sob intensidade luminosa de 60 a 70μmol de fótons/m²/s de lâmpadas fluorescentes brancas, em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C.

O experimento foi conduzido em um delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 4 com oito tratamentos: dois regimes de fotoperíodo, curto (11h) e longo (16h), combinados com quatro períodos de vernalização (zero, 30, 60 e 90 dias) em câmara frigorífica a 4°C. Cada unidade

experimental foi constituída de um frasco de vidro de 240ml com três plantas, repetida dez vezes.

Dados de número de bulbos por planta, diâmetro de bulbo, massa fresca de bulbo, altura de plantas, número de raízes por planta e número de folhas por planta foram coletados após 70 dias de cultivo em meio de bulbificação e foram submetidos a análise de variância (teste F) e análise de regressão, de acordo com Compton (1994). Os dados de porcentagem de bulbificação foram submetidos a análise não paramétrica (teste Kruskal-Wallis) por não terem apresentado distribuição normal para os fatores testados. Para as análises foi utilizado o programa SAS (versão 9.0).

Os valores de razão bulbar foram calculados a partir de plantas submetidas aos dois regimes de fotoperíodo zero, 10, 20, 30, 40, 50 e 70 dias após a transferência das plantas para o meio de bulbificação. O cálculo foi efetuado a partir da relação entre o diâmetro da base do pseudocaule e o maior diâmetro da base das plantas, utilizando a média de cinco plantas. No presente trabalho, optou-se por considerar o valor de razão bulbar 0,5 como ponto de referência para identificar o início do processo de formação de bulbos de alho *in vitro*.

Resultados e discussão

Constatou-se efeito simples da vernalização sobre o número de bulbos por planta e sobre o diâmetro de bulbos (Tabela 1). O comportamento quadrático ($p \leq 0,05$), revelado pela regressão polinomial, mostra que o número máximo de bulbos por planta (1,8) foi estimado com a aplicação de aproximadamente 73 dias de vernalização dos bulbilhos fornecedores de meristemas (Figura 1, A), e o diâmetro máximo de bulbo (6,6mm) foi estimado com a aplicação de 45 dias de vernalização dos bulbilhos (Figura 1, B).

Esses resultados diferem dos apresentados por Yuri et al. (2005) com o cultivar de alho Roxo Pérola de Caçador. Esses autores observaram um comportamento linear para número de bulbos por planta em função do tempo de vernalização, sendo 90 dias o período que

Tabela 1. Níveis de significância na análise da variância e na análise não paramétrica da variável bulbificação para os fatores fotoperíodo e tempo de vernalização de bulbilhos de alho cultivar Jonas após 70 dias em cultivo *in vitro* em meio de cultura de bulbificação

Nível dos fatores	Número de bulbos por planta	Bulbificação (%)	Diâmetro de bulbo (mm)	Massa fresca de bulbo (mg)	Altura das planta (cm)	Número de folhas por planta
Fotoperíodo (FP)	2,68 ^{ns(1)}	-	3,24 ^{ns}	6,37 ^{ns}	4,53 ^{ns}	0,06 ^{ns}
Vernalização (V)	30,02 ⁽²⁾	-	440,64 ^{ns}	136,93 ^{ns}	120,75 ^{ns}	0,51 ^{ns}
FP x V	0,10 ^{ns}	-	1,75 ^{ns}	4,75 ^{ns}	7,06 ^{ns}	0,82 ^{ns}
Kruskal-Wallis	-	38,26 ⁽³⁾	-	-	-	-
CV (%)	28,9	17,7	3,3	3,2	2,7	14,9

(1) ^{ns} = Teste F não significativo ($p > 0,05$).

(2) Teste F significativo ($p \leq 0,05$).

(3) Teste χ^2 significativo ($p \leq 0,01$).

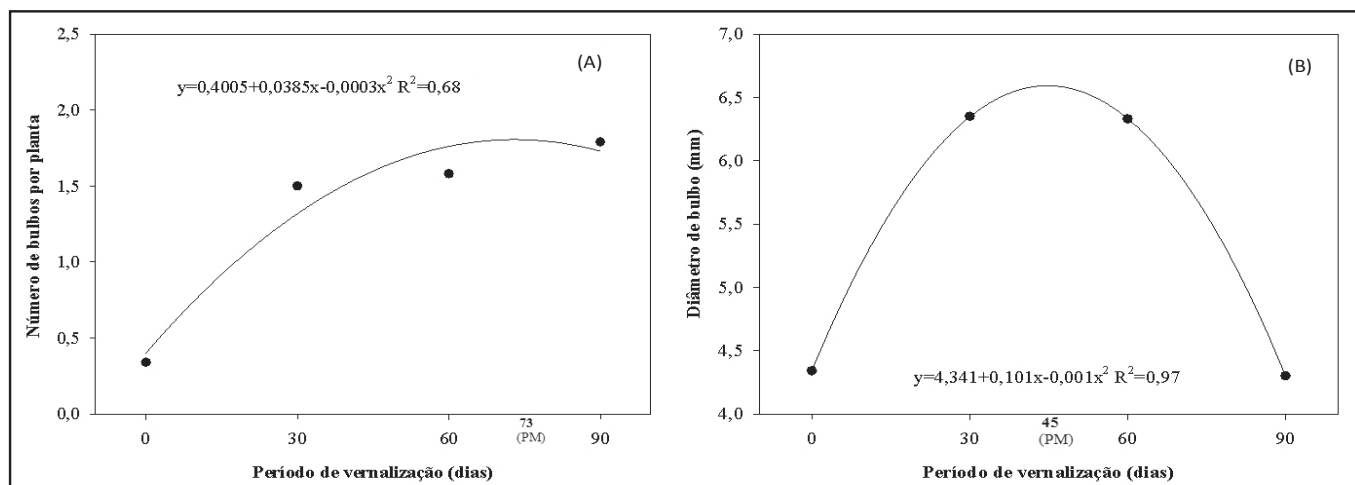


Figura 1. (A) Número de bulbos por planta e (B) diâmetro de bulbo de alho cultivar Jonas em função do período de vernalização dos bulbilhos fontes de meristemas, após 70 dias em cultivo *in vitro* em meio de cultura de bulbificação. Os valores são médias dos dois fotoperíodos utilizados.

PM = período de máxima eficiência.

Teste F significativo ($p \leq 0,05$).

promoveu o maior incremento (1,81 bulbo). O número máximo de bulbos por planta observado no presente trabalho também foi inferior ao observado no trabalho de Rossi et al. (1995), que obtiveram uma taxa de proliferação no número de bulbos de 1:4 para o cultivar de alho Piacentino Bianco. No entanto, ressalta-se que no presente trabalho foi utilizado outro cultivar, o que pode ter influenciado os dados obtidos.

Houve interação entre fotoperíodo e vernalização para massa fresca de bulbo e altura de plantas (Tabela 1), indicando interdependência entre esses fatores ambientais. As massas frescas máximas estimadas de bulbo para dias curtos e dias longos (223,6 e 220,4mg, respectivamente) foram obtidas com aproximadamente 45 dias de vernalização (Figura 2, A), com resposta mais sensível em fotoperíodo curto. Yuri et al. (2005) con-

cluíram que 90 dias de vernalização a $5^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, além de ter proporcionado o maior número de bulbos por ápice caulinar, foi o tratamento mais eficaz para aumentar o peso de massa fresca total de bulbos. No entanto, esses autores utilizaram temperatura maior que a utilizada neste trabalho, fator que, provavelmente, influenciou o maior período de vernalização além da diferença genética entre os dois cultivares testados.

O aumento do tempo de vernalização dos bulbos reduziu a altura das plantas nos dois regimes de fotoperíodo (Figura 2, B). Observou-se também que, em fotoperíodo curto, a redução do tamanho das plantas estabilizou-se a partir dos 63 dias de vernalização, enquanto em fotoperíodo longo não foi observada essa estabilização. Quanto à bulbificação, todos os períodos de vernalização proporcionaram bulbificação

em 100% das plantas, independentemente do fotoperíodo utilizado, quando comparado com tratamento zero. Não houve, portanto, variância que justificasse uma análise de regressão.

Os resultados do presente estudo demonstram que a vernalização de bulbilhos fornecedores de explantes para o cultivo de plantas de alho *in vitro* é indispensável para promover a indução e o crescimento de bulbos, visto que as condições climáticas em ambientes de laboratório fogem do padrão exigido pela cultura do alho. Contudo, tais resultados podem ser comparáveis a resultados de pesquisas realizadas em condições de campo.

No que se refere ao tamanho de bulbos produzidos, Carvalho et al. (1980) e Silva et al. (2002) relatam que a vernalização de bulbilhos-sementes por períodos acima de 40 dias reduz o peso

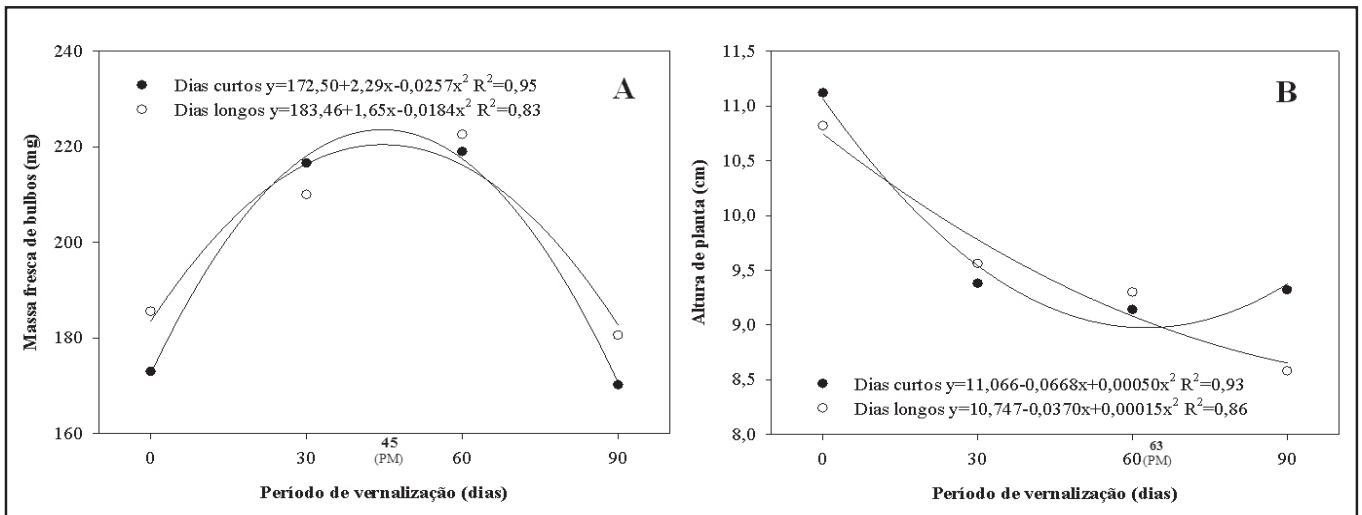


Figura 2. (A) Massa fresca de bulbo e (B) altura de plantas de alho cultivar Jonas, em função do fotoperíodo e do período de vernalização dos bulbilhos doadores de meristemas, após 70 dias em cultivo *in vitro* em meio de cultura de bulbificação. Dias curtos = 11h de luz; dias longos = 16h de luz.

PM = período de máxima eficiência.

Teste F significativo ($p \leq 0,05$).

médio de bulbos produzidos no campo, além de proporcionar a redução no ciclo de vários cultivares.

Na Figura 3 são apresentados os efeitos dos tratamentos de vernalização na razão bulbar (RB), nas duas condições de fotoperíodo. Nota-se que, independentemente do fotoperíodo, nas plantas provenientes de bulbilhos não vernalizados, os bulbos não atingiram o valor referência de RB. Em fotoperíodo curto verificou-se redução da RB à medida que se intensificou o tempo de vernalização dos bulbilhos. Aproximadamente aos 23 dias após a transferência para meio de bulbificação, as plantas

oriundas de bulbilhos vernalizados por 60 e 90 dias, cultivadas em fotoperíodo curto, mostraram maior sensibilidade à vernalização, apresentando RB abaixo de 0,20 no final do ciclo. Por outro lado, em fotoperíodo longo as plantas atingiram RB 0,5 apenas aos 27 dias após a transferência para meio de cultura de bulbificação (Figura 4).

Os resultados observados são concordantes com os de Silva et al. (2002), que observaram resposta linear à intensidade de vernalização com redução da RB à medida que se intensificou o tempo. Esses resultados, porém, devem ser tomados com cautela, visto que outros

fatores podem contribuir para afetar a conformação do bulbo, tal como a adição de carboidratos. O aumento da oferta desse componente também promove o aumento da RB em níveis que podem comprometer a qualidade dos bulbos (Longo, 2009).

Conclusões

Plantas de alho cultivadas *in vitro* apresentam respostas morfogênicas na indução e no desenvolvimento de bulbos do tipo termodependente, considerando-se o diâmetro do bulbo e o número de bulbos por planta, e termo-

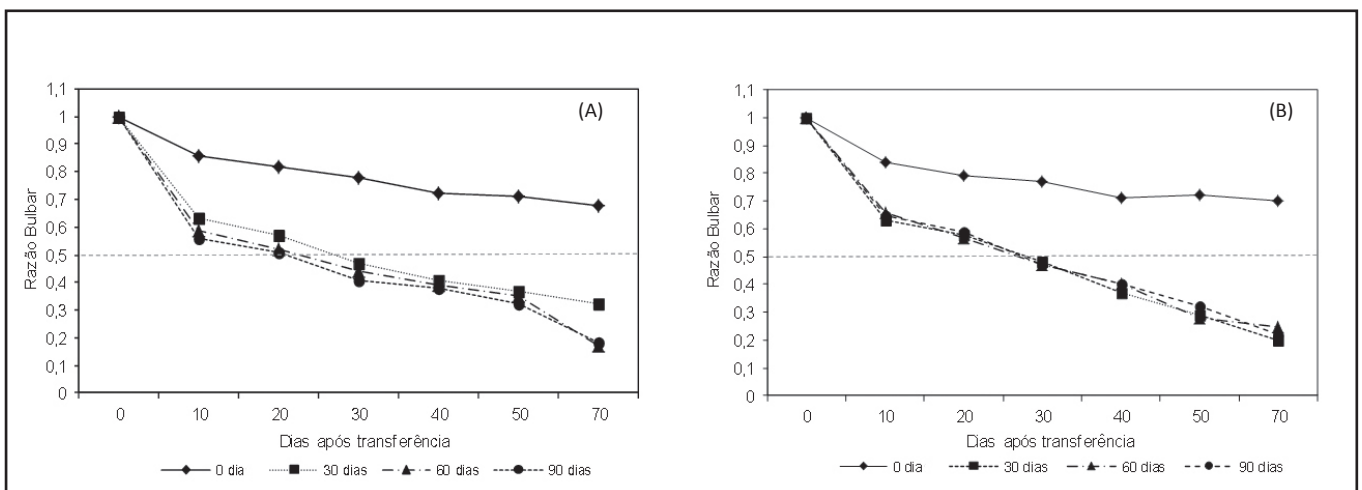


Figura 3. Razão bulbar observada em plantas de alho cultivar Jonas durante o cultivo *in vitro*, em (A) dias curtos e (B) dias longos, a partir de meristemas extraídos de bulbilhos vernalizados por períodos de 0, 30, 60 e 90 dias em câmara fria a 4°C. Observações realizadas após a transferência das plantas para o meio de bulbificação. A linha horizontal, tracejada na altura do valor 0,5, sugere o ponto de início da bulbificação.



Figura 4. Plantas de alho do cultivar Jonas micropropagadas a partir de meristemas extraídos de bulbilhos vernalizados durante 60 dias em câmara fria a 4°C, em fotoperíodo longo. Observaram-se diferentes valores de razão bulbar em diferentes épocas de crescimento do bulbo, aos 6, 27 e 70 dias após a transferência das plantas para meio de cultura de bulbificação. O início do acúmulo de reserva em um bulbo com razão bulbar 0,5 é indicado por seta vermelha

fotoperiódica dependente para massa fresca de bulbo e altura de plantas.

Maior tempo de exposição (> 30 dias a 4°C) de plantas ao frio elimina a sensibilidade ao fotoperíodo para a indução da bulbificação.

O tempo de vernalização dos bulbilhos doadores de meristemas influencia o valor da razão bulbar com maior intensidade no fotoperíodo curto.

Agradecimento

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

Literatura citada

1. ASCOUGH, G.D.; ERWIN, J.E.; VAN STADEN, J. In vitro storage organ formation on ornamental geophytes.

American Society of Horticultural Science, v.12, n.34, p.417-444, 2008.

2. BIASI, J.; MUELLER, S. Comportamento de cultivares de alho no Planalto Catarinense. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.7, n.1, p.7-9, 1999.

3. BREWSTER, J.L. *Onions and other vegetables Alliums*. 2.ed. Wallingford: CAB International, 2008. 432p.

4. BURBA, J.L. Efeito do manejo de alho-semente (*Allium sativum L.*) sobre a dormência, crescimento e produção da cultivar Chonan. Viçosa, 1983. 112f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1983.

5. CARVALHO, C.G.S.; MONNERAT, P.H.; CARVALHO, Y. Efeito de tratamentos pré-plantio de bulbilhos de alho cv. Amaranthe. *Revista de Olericultura*,

Viçosa, v.15, n.1, p.165-173, 1980.

6. COMPTON, M. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, v.37, p.217-242, 1994.

7. FERREIRA, F.A.; CASALI, V.W.D.; SOARES, J.G. Dormência de bulbos de alho. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v.12, n.142, p.3-7, 1986.

8. FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. de C.L.; CHU, E.P.; ALMEIDA, V.P. Tuberização In: KERBAUY, G.B. (Org.). *Fisiologia vegetal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p.409-420.

9. LONGO, A.E.O. *Micropropagação de alho e ginogênese in vitro de cebola*. 2009. 130f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agrônomo, Campinas, SP, 2009.

10. MENEZES SOBRINHO, J.A. *Cultivo do alho (Allium sativum L.)*. 3.ed. Brasília: Embrapa-CNPq, 1997. 16p. (Embrapa-CNPq. Instruções Técnicas, 2).

11. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v.15, p.473-497, 1962.

12. ROSSI, V.; MARANI, F.; BABITI, A.L. Phenylurea derivatives for micropropagation of garlic meristems. *Acta Horticulturae*, n.394, p.263-271, 1995.

13. SILVA, E.C.; SILVA, F.M.; SOUZA, R.J. et al. Estudo da degenerescência de clones de cultivares de alho provenientes de cultura de tecidos. *Horticultura Brasileira*, v.20, n.2, 2002. Suplemento 2.

14. TESFAY, S.Z.I.; BERTLING, A.O.; ODINDO, P.L. et al. Growth responses of tropical onion cultivars to photoperiod and temperature based on growing degree days. *African Journal of Biotechnology*, v.10, n. 71, p.15875-15882, 2011.

15. YURI, J.E. MOTA, J.H.; SOUZA, R.J. et al. Vernalização do alho para cultivo in vitro. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.17, n.2, p.118-124, 2005. ■