

RENATO LUIS VIEIRA

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E FITOSSANITÁRIOS NA
MICROPROPAGAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DE ALHO-
SEMENTE LIVRE DE VÍRUS**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciências, área de concentração Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva
Co-Orientador: Dr. Gilmar Roberto Zaffari

Florianópolis
Estado de Santa Catarina – Brasil
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Vieira, Renato Luis

Aspectos fisiológicos e fitossanitários na
micropropagação para a obtenção de alho-semente livre de
vírus [tese] / Renato Luis Vieira ; orientador, Aparecido
Lima da Silva ; co-orientador, Gilmar Roberto Zaffari. -
Florianópolis, SC, 2012.

193 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Allium sativum. 3.
cultura de tecidos. 4. limpeza de vírus. 5. crioterapia. I.
Silva, Aparecido Lima da. II. Zaffari, Gilmar Roberto .
III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

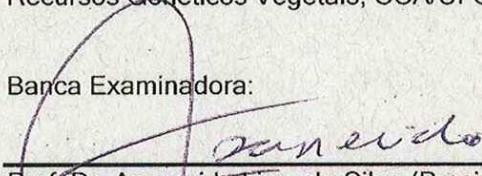
Aspectos fisiológicos e fitossanitários na micropropagação para a obtenção de alho-semente livre de vírus

por

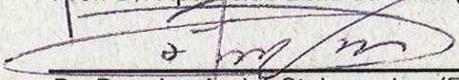
Renato Luís Vieira

Tese julgada e aprovada em 24/08/2012, em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

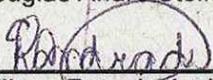
Banca Examinadora:



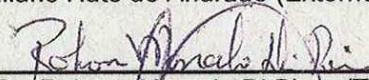
Prof. Dr. Aparecido Lima da Silva (Presidente /Orientador)



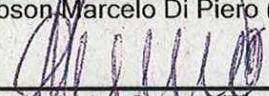
Dr. Douglas André Steinmacher (Externo/Inst. Biosomática-SP)



Dr^a. Eliane Rute de Andrade (Externo/EPAGRI)



Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero (Titular/UFSC)



Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra (Titular/UFSC)



Prof^a. Dr^a. Rosete Pescador (Titular/UFSC)

Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari (Coordenador do Programa)

Florianópolis, agosto de 2012

Dedico este trabalho aos meus familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

Como forma de expressar minha gratidão, quero deixar registrado meus sinceros agradecimentos:

Á Epagri, pela oportunidade concedida para realização deste curso. Aos amigos e colegas de trabalho da Estação Experimental de Caçador, que de uma maneira ou outra me apoiaram nos trabalhos de pesquisa no transcorrer do curso.

Á Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, pela concessão de bolsa, sem a qual tornaria mais difícil a realização desta pesquisa.

Ao Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Catarina pelos conhecimentos adquiridos e pela boa convivência com os funcionários e o corpo docente.

Ao Professor e orientador Dr. Aparecido Lima da Silva, pela amizade, confiança, ensinamentos e colaboração durante toda a pesquisa.

Ao pesquisador da Epagri e co-orientador Dr. Gilmar R. Zaffari por compartilhar seus conhecimentos e pela valiosa colaboração durante o curso.

Á todos os colegas do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do CCA-UFSC pela amizade e incentivo.

Ao colega Douglas A. Steinmacher, pela amizade e pelo constante apoio científico dado durante a realização de parte das pesquisas.

Aos colegas e colaboradores do LAMAR/CCB/UFSC, em especial à Ticiani e Éder pelo apoio dado em minhas análises e à Professora Zenilda L. Bouzon pela recepção e acessória no Laboratório.

Á professora Dra. Helenice Mercié do departamento de Botânica da USP pela oportunidade concedida para realizar as análises de hormônios e ao Dr. Maxuel de Oliveira Andrade pelo acompanhamento durante a realização das análises,

A todos o meus familiares e amigos, que de alguma forma contribuíram para realização de mais esta etapa de minha vida.

RESUMO

Com uso intensivo de mão-de-obra, tecnologia e capital, a cultura do alho no Brasil tem viabilizado a pequena e média propriedade nas principais regiões produtoras, sendo portanto, de grande importância sócio-econômica. O alho (*Allium sativum* L.), por ser propagado vegetativamente, facilita a disseminação de patógenos, como vírus, favorecendo o aparecimento de doenças complexas, pelo acúmulo de diferentes espécies virais numa mesma planta, acarretando diminuição da produtividade e da qualidade do produto. Uma das técnicas mais utilizadas para limpeza clonal de alho é a cultura de meristemas. Apesar de muito utilizada para eliminação de viroses, percebe-se que há uma deficiência nos protocolos atualmente utilizados no que se refere à qualidade da semente produzida. Isto pode estar ligado aos fatores fisiológicos, fitossanitários e, principalmente, à inexistência de estudos para o desenvolvimento de protocolos de limpeza clonal mais eficientes. O presente trabalho teve como objetivos: (i) estudar o padrão de organização morfológica da bulbificação em alho, descrevendo os efeitos dos fatores envolvidos nesse processo; (ii) estudar a morfogênese de plantas de alho *in vitro* através de avaliações de componentes de meios de cultura e de fatores ambientais que afetam a indução de bulbos; (iii) avaliar as alterações de substâncias endógenas durante o crescimento das plantas e seus efeitos sobre o processo de bulbificação; e (iv) desenvolver um método de crioterapia para remoção do complexo viral do alho a partir do estabelecimento de um protocolo de criopreservação. No Capítulo I, além de um estudo do padrão morfológico da bulbificação, é apresentada uma revisão atualizada dos temas abordados no trabalho com o referencial teórico e as informações disponíveis até o presente. Para o estudo da morfogênese de plantas de alho *in vitro* foram avaliados os efeitos de tipos e concentrações de reguladores de crescimento e de carboidratos, de períodos de vernalização dos explantes, e os efeitos dos regimes de temperatura e fotoperíodo sobre a diferenciação de gemas de bulbos. As dosagens dos níveis endógenos de Ácido Abscísico e açúcares solúveis totais foram realizadas por testes imunoenzimático-ELISA e pela técnica colorimétrica fenol-sulfúrico, respectivamente. O desenvolvimento do protocolo de criopreservação foi efetuado mediante exposição de ápices caulinares nas soluções de vitrificação PVS2 e PVS3. Posteriormente, a solução com melhor desempenho foi utilizada para crioterapia. A

crioterapia foi comparada com os métodos tradicionais de limpeza de vírus em alho. Os resultados aqui apresentados mostram evidências de que plantas de alho cultivadas *in vitro* também apresentam respostas morfogênicas para a diferenciação e desenvolvimento de bulbilhos do tipo termo-fotoperiódico dependente. Ficou evidenciado que o tempo de exposição ao frio reduz a sensibilidade ao fotoperíodo para a indução da bulbificação. Os resultados sugerem a participação do Ácido Abscísico e dos carboidratos solúveis, respectivamente, como agentes inibidores e indutores da bulbificação, em resposta à estímulos climáticos como temperatura e fotoperíodo. Para identificar a real importância desses compostos nesse processo, sugere-se um estudo minucioso da histodiferenciação de bulbos para identificar com maior precisão o momento exato da diferenciação durante a ontogênese das plantas. A solução de vitrificação PVS3 proporcionou a maior taxa de sobrevivência de explantes criopreservados, e foi utilizada no tratamento de crioterapia para erradicação do complexo viral do alho. Entre os diferentes métodos de limpeza de vírus avaliados neste trabalho, a crioterapia de ápices caulinares, associada ou não com a termoterapia, apresentou a maior taxa de eliminação de *Onion yellow dwarf virus* (OYDV), *Garlic common latent virus* (GCLV) e, principalmente de *Leek yellow stripe virus* (LYSV), ausente em 100% das amostras sobreviventes. A imunolocalização de OYDV revelou a presença do vírus em quase todas as partes do ápice caulinar, incluindo a porção distal do domo meristemático e os primórdios foliares. A distribuição dessa espécie de vírus em tecidos de ápices caulinares de alho pode estar associada com o desenvolvimento de plasmodesmos e sua capacidade de dar suporte a sua circulação. Apoiado nessas observações, sugere-se que *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) invade eficientemente as células de ápices caulinares de alho. Os resultados obtidos a partir desse trabalho de tese ampliam a base científica e permitem aprofundar a compreensão dos fatores associados a morfogênese de plantas de alho *in vitro*. O estabelecimento de um protocolo completo de criopreservação de alho se configura em uma ferramenta para erradicação de viroses em plantas de alho e, sobretudo, para o estabelecimento de um programa de conservação de germoplasma dessa espécie.

Palavras-chave: Alho. Bulbificação. vernalização. cultura de tecidos. Micropropagação. crioterapia.

ABSTRACT

With the intensive use of labor, technology and capital, the culture of garlic in Brazil has enabled the small and medium property in the main producing regions, thus being of a high socio-economic relevance. Garlic (*Allium sativum* L.), due to its vegetative propagation, facilitates the spread of pathogens, such as virus, favoring the outbreak of complex diseases, due to the accumulation of different virus species in the same plant. That entails the decrease of productivity and a decrease of the quality of the product. One of the most used techniques for pathogen removal from garlic is the culture of meristems. Even though it is widely used to eliminate viruses, it is easy to perceive that there are deficiencies in the protocols involving the quality of the produced seeds. This may be related to physiological and phytosanitary factors, and also to the lack of studies developing more efficient protocols for pathogen removal. This study has the following objectives: (i) to study the pattern of the morphological organization of garlic bulbing, describing the effects of the factors involved within the process; (ii) to study the morphogenesis of in vitro garlic plants through assessments of the components of the growing medium and the environmental factors that affect bulbing induction; (iii) to assess the changes of endogenous substances during the growth of the plants and their effects on the bulbing process; and (iv) to develop a method of cryotherapy for viral complex removal in garlic, upon the establishment of a protocol for cryopreservation. In chapter I, alongside the study of the morphological pattern of bulbing, it is presented an updated review of the topics tackled within this work, with the theoretical framework and the information available up to the present. For the study of morphogenesis of in vitro garlic plants, it was carried out an assessment of the effects of different types and concentrations of growth regulators and carbohydrates, of the periods of vernalization of plantlets, and the effects of temperature regimes and photoperiods affecting the differentiation of bulb buds. The dosage of the endogenous levels of abscisic acid and total soluble sugars were carried out through immunoenzymatic-ELISA tests and through the colorimetric phenol-sulfuric technique, respectively. The development of the protocol for cryopreservation was carried out through the exposure of the shoot tips to the vitrification solutions PVS2 and PVS3. Later, the solution with the best performance was used for cryotherapy. Cryotherapy were

compared to the traditional methods for virus removal in garlic. The results reported here evidence that garlic plants grown *in vitro* also present morphogenetic answers to the differentiation and development of thermo- and photoperiod- dependent bulbils. It also became evident that the time of exposure to cold decreases the sensitivity to the photoperiod for bulbing induction. The results suggest that the abscisic acid and the soluble carbohydrates participate, respectively, as inhibiting agents and bulbing inductors, in response to climatic stimuli such as temperature and photoperiod. To identify the actual relevance of those compounds within this process, it is suggested a thorough study of bulb histodifferentiation in order to identify more precisely the exact moment of differentiation during the ontogeny of the plants. The solution of vitrification PVS3 provided a higher survival rate of cryopreserved plantlets, and it was used in the cryotherapy treatment to eradicate the viral complex from the garlic. Among the different methods for virus removal assessed in this work, the cryotherapy of garlic shoot tips, whether associated with thermotherapy or not, showed a higher frequency in the elimination of the *Onion yellow dwarf Virus* (OYDV), the *Garlic common latent virus* (GCLV) and mainly the *Leek yellow stripe virus* (LYSV), which was absent in 100% of the surviving samples. The immunolocalization of OYDV showed the presence of the virus in almost all parts of the shoot tip, including the distal portion of the meristematic dome and the leaf primordia. The distribution of this species of virus in shoot tip tissues of garlic may be associated with the development of plasmodesms and with its capability to give support to their circulation. Upon these observations, it is suggested that the Onion yellow dwarf virus (OYDV) efficiently invades the cells of the garlic shoot tips. The results achieved by this research project broaden the scientific basis and allow the deepening of the comprehension of the factors associated with the morphogenesis of *in vitro* garlic plants. The establishment of a complete protocol for the cryopreservation of garlic is a tool for the eradication of viruses in garlic plants and, above all, for the establishment of a program for preserving germplasm of this species.

Key-words: Garlic. Bulbing. Vernalization. tissue culture. Micropropagation. cryotherapy.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1: Distribuição geográfica no continente euro-asiático de vários grupos de alho	36
Figura 2: Etapas fenológicas do alho cv “Jonas”, do plantio a colheita (junho a dezembro), temperatura média mensal (diurna e noturna) e fotoperíodo, de acordo com a fase de crescimento da planta	42
Figura 3: Estrutura do bulbilho de alho	44
Figura 4: Estrutura de bulbos de alho do grupo comum e nobre	46
Figura 5: Diagrama das etapas culturais e da fisiologia da planta do alho	49
Figura 6: Plantas de alho cultivar ‘Jonas’ livre de vírus e com sintomas de Mosaico	53
Figura 7: Diagrama da limpeza de vírus de alho através da cultura de meristema associada à termoterapia	59
Figura 8: Bulbos de alho livres de vírus	60

CAPÍTULO II

Figura 1: Plantas de alho cultivar “Jonas” na fase de bulbificação, cultivadas em meio de MS contendo AIA e ANA ..	96
Figura 2: Regressão polinomial para diâmetro de bulbo, massa fresca de bulbo, altura de planta, e número de folhas por planta de alho cultivar “Jonas”, em função de concentrações de sacarose	102
Figura 3: Regressão polinomial para diâmetro e massa fresca de bulbo de plantas de alho cultivar ‘Jonas’, em função de concentrações de frutose	103
Figura 4: Microbulbos de alho cultivar “Jonas”, regenerados em meio de cultura sob diferentes concentrações de sacarose	104
Figura 5: Número de bulbos por planta e diâmetro de bulbo de alho cultivar ‘Jonas’ em função do período de vernalização dos bulbilhos fontes de meristemas	106
Figura 6: Massa fresca de bulbo e altura de plantas de alho cultivar “Jonas”, em função do fotoperíodo e do tempo de vernalização dos bulbilhos doadores de meristemas	106

Figura 7: Razão bulbar observada em plantas de alho cultivar “Jonas” cultivadas <i>in vitro</i> , sob dias curtos e dias longos, a partir de meristemas extraídos de bulbilhos vernalizados	108
Figura 8: Plantas de alho da cultivar “Jonas” micropropagadas a partir de meristemas extraídos de bulbilhos vernalizados durante 30 dias a +4° C	109
Figura 9: Secção transversal de microbulbos de alho da cultivar “Jonas” regenerados <i>in vitro</i> , não diferenciados e diferenciados.....	112

CAPÍTULO III

Figura 1: Plantas de alho da cultivar “Jonas” amostradas para análises de carboidratos solúveis e ABA	131
Figura 2: Cromatograma do ABA padrão (+) cis/trans-ABA, injetado em HPLC indicando o intervalo de coletas das frações das amostras	133
Figura 3: Esquema representativo de dosagem de ABA pelo teste imunoenzimático-ELISA	135
Figura 4: Níveis endógenos de açúcares solúveis totais (AST) em plantas de alho cultivadas a campo	137
Figura 5: Níveis endógenos de açúcares solúveis totais (AST) em plantas de alho cultivadas <i>in vitro</i>	139
Figura 6: Níveis endógenos de ácido abscísico (ABA) em plantas de alho cultivadas a campo	143
Figura 7: Níveis endógenos de ácido abscísico em plantas de alho cultivadas <i>in vitro</i>	145
Figura 8: Plantas de alho amostradas para análise de ABA e carboidratos solúveis aos 35 e aos 70 dias após transferência para meio de cultura de bulbificação	146

CAPÍTULO IV

Figura 1: Teste imunoenzimático <i>tissue printing</i> para detecção de vírus em bulbilhos de alho da cultivar “Jonas”.....	168
Figura 2: Detecção de <i>Onion yellow dwarf virus</i> (OYDV) por Dot-Elisa, em plantas de alho cultivar “Jonas” regeneradas <i>in vitro</i> , através dos métodos de cultura de meristemas, termoterapia seguida de cultura de meristema, crioterapia, e termoterapia seguida de crioterapia	171

Figura 3: Detecção de <i>Garlic common latent virus</i> , (GCLV) por RT-PCR, em amostras de três de plantas de alho cultivar “Jonas” obtidas pelos métodos de regeneração utilizado	174
Figura 4: Ápices caulinares de alho cultivar “Jonas” submetidos a tratamento em solução de vitrificação PVS3 e criopreservados em nitrogênio líquido, aos 15, aos 30 e aos 40 dias após o descongelamento	175
Figura 5: Alterações celulares em ápices caulinares de alho cv. “Jonas” associadas a criopreservação	176
Figura 6: Secções longitudinais de ápices caulinares de alho cultivar ‘Jonas’ criopreservados, corados com safranina 0,5% e observados em microscopia de luz	177
Figura 7: Plantas de alho da cultivar ‘Jonas’ regeneradas <i>in vitro</i> a partir de crioterapia de ápices caulinares, em vários estágios de crescimento	179
Figura 8: Detecção imunocitoquímica de <i>Onion yellow dwarf virus</i> (OYDV) infectando células do ápice caulinar de alho cultivar “Jonas”	181

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Principais espécies de vírus encontradas associadas à cultura do alho, gêneros correspondentes e seu grupo vetor	52
---	----

CAPÍTULO II

Tabela 1: Análise de variância e não paramétrica para número de bulbos por planta, porcentagem de bulbificação, diâmetro de bulbo e massa fresca de bulbo, em função do tamanho de bulbilhos de alho cultivar “Jonas” utilizados como fontes de explantes, cultivados em meio de cultura de MS	92
Tabela 2: Efeito da concentração dos reguladores de crescimento AIA, AIB, ANA, ABA e AJ nas variáveis número de bulbos por planta, porcentagem de bulbificação, diâmetro de bulbo, massa fresca de bulbo, altura de plantas, número de raízes por planta e número de folhas por planta de alho cultivar “Jonas”, após 110 dias de cultivo <i>in vitro</i> , em meio de cultura de MS	94
Tabela 3: Efeitos da combinação do BAP com as auxinas AIA, AIB, ANA, e AJ sobre as variáveis número de bulbos por planta, porcentagem de bulbificação, diâmetro de bulbo, e massa fresca de bulbo de alho cultivar “Jonas”	98
Tabela 4: Efeito das concentrações de sacarose, frutose e glicose nas variáveis número de bulbos por planta, porcentagem de bulbificação, diâmetro de bulbo, massa fresca de bulbo, altura de plantas, número de raízes por planta e número de folhas por planta de alho cultivar “Jonas”	100
Tabela 5: Análise de variância e não paramétrica para número de bulbos por planta, porcentagem de bulbificação, diâmetro de bulbo, massa fresca de bulbo, altura de plantas e número de folhas em função do fotoperíodo e do tempo de vernalização de bulbilhos de alho cultivar ‘Jonas’	105
Tabela 6: Análise de variância para número de bulbos por planta, porcentagem de bulbificação, diâmetro de bulbo, massa fresca de bulbos, altura de plantas e número de folhas por planta de alho cultivar “Jonas” em função da temperatura e	

fotoperíodo no 30º ao 60º dias do ciclo de cultivo <i>in vitro</i>	111
--	-----

CAPÍTULO IV

Tabela 1: Taxa de sobrevivência de ápices caulinares de alho cultivar “Jonas”, tratados em soluções de vitrificação PVS2 e PVS3 por diferentes períodos, e criopreservados ou não em nitrogênio líquido	169
Tabela 2: Efeito da cultura de ápices caulinares, cultura de meristemas, termoterapia seguida de cultura de meristemas, crioterapia e termoterapia seguida de crioterapia na taxa de sobrevivência e na eliminação de complexo viral de alho cultivar “Jonas”	173
Tabela 3: Detecção de seis espécies de vírus em alho cultivar ‘Jonas’ por RT-PCR, em amostras submetidas a diferentes processos de limpeza de vírus	174

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	Ácido bscísico
AIA	Ácido indolacético
AIB	Ácido indolbutírico
AJ	Ácido jasmônico
ANA	Ácido naftalenoacético
AST	Açúcares solúveis totais
AC	Ápice caulinar
Agf	Antígeno fixado
Agl	Antígeno livre
BAP	6-benzilaminopurina
BCIP	5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt
BHT	butil-hidroxi-tolueno
CV	Coeficiente de variação
CAC	Cultura de ápice caulinar
CM	Cultura de meristemas
DNA	Deoxyribonucleic acid
DAP	Dias após o plantio
DAT	Dias após transferência
DO	Densidade óptica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSD1	Formulação salina de Silva & Doazan (1995)
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FC	Fotoperíodo curto
FL	Fotoperíodo longo
GarMV	<i>Garlic mosaic virus</i>
Gar MbFV	<i>Garlic mite-borne filamentous virus</i>
GarV- A	<i>Garlic virus A</i>
GarV- B	<i>Garlic virus B</i>
GarV- C	<i>Garlic virus C</i>
GarV- D	<i>Garlic virus D</i>
GarV- E	<i>Garlic virus E</i>
GarV- X	<i>Garlic virus X</i>
GarMbLV	<i>Garlic mite-borne latent virus</i>
GCLV	<i>Garlic common latent virus</i>
HPLC	High Performance Liquide Chromatography
LYSV	<i>Leek yellow stripe virus</i>
MF	Massa fresca

MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MgCl	Cloreto de magnésio
MNC	Membrana de nitrocelulose
MS	Formulação salina de Murashige & Skoog
MO	Microscopia Ótica
NaCl	Cloreto de sódio
NBT	Nitro-blue tetrazolium chloride
NL	Nitrogênio líquido
OMbLV	<i>Onion mite-borne latent virus</i>
OYDV	<i>Onion yellow dwarf virus</i>
PVP	Polivinilpirrolidona
RB	Razão bulbar
RCP	Reguladores de Crescimento de Plantas
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
ShMbLV	<i>Shallot mite-borne latent virus</i>
ShV- X	<i>Shallot virus X</i>
TDZ	Tidiazuron
2iP	Isopenteniladenina.

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	centímetro
et al.	e outros
°C	graus Celcius
g L⁻¹	grama por litro
ha	hectare
Kg	kilograma
mL	mililitro
mm	milímetro
mg L⁻¹	miligrama por litro
mM	milimolar
M	molar
nm	nanômetro
Pmol	picomoles
μM	micromol
μm	micrômetro
μL	microlitro
ng	nanograma
μg	micrograma

SUMÁRIO

	Pág.
INTRODUÇÃO GERAL	27
Referências Bibliográficas	32
CAPÍTULO I: ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DO ALHO <i>(Allium sativum L.)</i>	
1. História e Centros de Origem	35
2. Taxonomia e descrição morfológica.....	37
3. Melhoramento e Recursos Genéticos	38
4. Crescimento e desenvolvimento	40
4.1. Bulbificação	41
4.2. Desenvolvimento de dormência	48
4.3. Vernalização	50
5. Aspectos fitossanitários da cultura do alho	51
5.1. Complexo viral do alho	51
5.2. Infecção de plantas por vírus	54
5.3. Diagnose	55
5.4. Micropropagação do alho e limpeza de vírus	56
5.5. Criopreservação e crioterapia	60
6. Referências bibliográficas	65
CAPÍTULO II: MORFOGÊNESE DE PLANTAS DE ALHO <i>(Allium sativum L.) IN VITRO: INFLUÊNCIA DO EXPLANTE,</i> REGULADORES DE CRESCIMENTO, CARBOIDRATOS E CONDIÇÕES DO AMBIENTE.	
1. Introdução	83
2. Material e métodos	87
3. Resultados e discussão	92
3.1. Efeito do tamanho do bulbilho fonte de meristema no crescimento de plantas de alho <i>in vitro</i>	92
3.2. Efeito do tipo e da concentração de reguladores de crescimento de plantas na indução de bulbos de alho <i>in vitro</i>	93
3.3. Efeito do tipo e da concentração de carboidratos na indução de bulbos de alho <i>in vitro</i>	98
3.4. Efeito do tempo de vernalização de bulbilhos doadores de meristemas e do fotoperíodo na indução de bulbos de alho	

<i>in vitro</i>	104
3.5. Efeito da temperatura e do fotoperíodo na diferenciação de gemas e na indução de bulbos de alho <i>in vitro</i>	109
4. Conclusões	113
5. Referências bibliográficas	114

CAPÍTULO III: ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS ENDÓGENOS DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS E ÁCIDO ABCSÍCIO EM PLANTAS DE ALHO E RESPOSTAS NO PROCESSO DE BULBIFICAÇÃO.

1. Introdução	125
2. Material e métodos	129
2.1. Condições de cultivo das plantas amostradas	129
2.1.1. <i>In vitro</i>	129
2.1.2. <i>In vivo</i>	130
2.2. Coleta e armazenagem de amostras para análises de carboidratos e ácido abscísico	130
2.3. Extração e quantificação de carboidratos solúveis	132
2.4. Extração e quantificação de Ácido Abscísico	132
2.5. Dosagem do teor de ABA através de teste imunoenzimático ELISA	134
2.6. Análises estatísticas	136
3. Resultados e discussão	136
4. Conclusões	147
5. Referências Bibliográficas	148

CAPÍTULO IV: ELIMINAÇÃO DE COMPLEXO VIRAL EM ALHO POR CRIOTERAPIA

1. Introdução	155
2. Material e métodos	158
2.1. Estabelecimento de um protocolo para criopreservação de Ápices caulinares de alho	158
2.2. Comparação da eficiência de métodos de limpeza de vírus Em alho	160
2.3. Análises estatísticas	162
2.4. Diagnose de vírus	162
2.5. Análises histológicas	165
2.6. Análise imunocitoquímica	166
3. Resultados e discussão	167
3.1. Estado fitossanitário dos bulbilhos doadores de explantes	167

3.2. Estabelecimento de protocolo para criopreservação de alho	168
3.3. Crioterapia de ápices caulinares para remoção do complexo viral do alho	170
4. Conclusões	183
6. Considerações finais	185
5. Referências Bibliográficas	187

INTRODUÇÃO GERAL

O alho (*Allium sativum* L.) é uma monocotiledônea, pertencente à família *Aliaceae* e originário da Ásia Central. Registros históricos comprovam o uso desta planta pelos hindus, egípcios, gregos e por quase todos os antigos povos do Velho Mundo (Mota et al., 2005). Segundo Menezes Sobrinho (1984 e 1997), é possível que o alho plantado no Brasil tenha vindo do México, do Egito e de alguns países da América do Sul. É uma planta anual, bulbosa, e sua propagação se dá de forma assexuada através do plantio dos bulbilhos (ou dentes).

O alho é uma hortaliça que possui alto valor nutricional e em sua composição estão: vitaminas (A, B2, B6, C), aminoácidos, adenosina, sais minerais (ferro, silício, iodo), enzimas, como a alinase, diretamente responsável pela quebra da alicina, óleo volátil sulfuroso liberado quando as células do bulbilho são rompidas. Esta substância, que tem o cheiro marcante, tem potencial fitoterápico que atua na inibição da atividade de bactérias e fungos patogênicos a animais e vegetais (Yoshida et al., 1987; Ress et al., 1993; Wilson et al., 1997; Bianchi et al., 1997; O’Gara et al., 2000). Essas características tornam o alho, uma especiaria extremamente atrativa de ser incluída no cardápio diário, não somente pelo seu aroma e sabor, mas também pelos seus benefícios medicinais.

Existem no mundo quatro grandes centros de produção de alho: asiático, europeu, norte-americano e sul-americano. O centro mais importante é o asiático, onde se destaca a China como o maior produtor, consumidor e exportador mundial. No Brasil, a cultura se estende por quase todo território concentrando-se, principalmente, nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. O alho “nobre” é cultivado do Rio Grande do Sul a Bahia. Duas regiões destacam-se: o Sul, na Serra Gaúcha e Planalto de Santa Catarina, e o Centro-Oeste e Sudeste, com dois pólos de produção: Região do Alto Paranaíba-MG e Cristalina-GO.

O consumo *per capita* no país tem aumentado significativamente, passando de 400 gramas/habitante/ano na década de 1980 para 1,26 quilos em 2010 (IBGE, 2011). O Brasil consumiu, no ano de 2010, 240 mil toneladas de alho, desse total, 153.141 toneladas foram de alhos importados e 86.859 toneladas de alho nacional (IBGE, 2011). O restante da produção nacional foi utilizado para semente. Atualmente, a importação de alho da China e da Argentina é responsável por cerca de

63% do abastecimento nacional, cabendo à produção nacional a oferta de 37% do consumo total (Epagri/Cepa, 2011).

O Estado de Santa Catarina é um dos principais produtores brasileiro de alho “nobre”, respondendo atualmente por cerca de 17,6% da produção nacional (Epagri/Cepa, 2011). O uso intensivo de mão-de-obra, tecnologia e capital, têm viabilizado a pequena e média propriedade nas regiões produtoras, sendo, portanto, de grande importância sócio-econômica para o Estado. No entanto, os últimos quinze anos, foi um período crítico para a produção de alho não só em Santa Catarina, mas em todo o país. O alto volume de importação, principalmente da China, reflete diretamente sobre o pequeno produtor, com a descapitalização, inviabilizando dessa forma a permanência nessa atividade. A baixa produtividade e o alto custo de produção estão entre as causas que mais contribuem para agravar a crise.

A única via de propagação comercial do alho é mediante o uso de bulbilhos. Isto faz com que muitas doenças, causadas principalmente por vírus, sejam transmitidas e intensificadas em plantios sucessivos, acarretando diminuição da produtividade e qualidade do produto colhido (Dusi, 1995), uma vez que a maioria das cultivares de alho plantada no Brasil e em vários países do mundo, está infectada com uma ou mais viroses (Daniels, 1999; Silva et. al., 2002; Melo Filho et al., 2004; Fayad André, 2010).

Os aspectos fitossanitários constituem um dos principais fatores limitantes ao rendimento desta cultura. A ocorrência de pragas e doenças pode inviabilizar a atividade, devido à redução dos aspectos qualitativo e quantitativo em níveis insatisfatórios. Os agentes virais destacam-se como importante problema fitossanitário da cultura do alho, em razão dos eficientes mecanismos de disseminação, via bulbilhosamente e/ou por insetos vetores e por falta de uma eficiente prática e econômica de controle a campo (Massola Junior et al., 2005).

As espécies pertencentes aos gêneros Potyvirus, Carlavirus e Alexivirus, têm sido detectadas em plantas de alho em regiões produtoras de vários países (Melo filho, 2003; Chen et al., 2008). Os principais vírus constatados no Brasil até o momento foram, *Leek yellow strip virus* (LYSV) (Pavan et al., 1989; Dusi et al., 1994) e *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) (Assis et al., 1993), pertencentes ao gênero Potyvirus, *Garlic common latent virus* (GarCLV), membro do gênero Carlavirus (Massola Junior et al., 2005) e *Garlic virus A* (GarV- A), *Garlic virus B* (GarV-B), *Garlic virus C* (GarV-C) e *Garlic vírus D*

(GarV-D), pertencentes ao gênero *Allexivirus* (Melo Filho et al., 2004; Fayad André, 2010).

As enfermidades de etiologia viral produzem sintomas variados em alho, ou então, são assintomáticas. Geralmente, as infecções são causadas por mais de um vírus em complexo (Daniels, 1999). Virose do grupo *Carlavirus* e *Potyvirus* têm sido freqüentemente relatadas em infecções múltiplas (Dusi, 1995; Conci et al., 2003; Melo Filho et al., 2004) em regiões da Argentina e do Brasil, portanto aferindo que a capacidade efetiva de produtividade da maioria das cultivares de alho “nobre” ainda é desconhecida (Fayad André, 2010).

A utilização de sementes livres de vírus, produzidas a partir de técnicas de cultura de tecidos de plantas, surgiu recentemente na cadeia produtiva de alho no Brasil, como uma alternativa para melhorar a produtividade das lavouras no país. Tais sementes, embora de preço superior às produzidas pelo método convencional, têm a vantagem de serem isentas de doenças causadas por vírus, além de apresentarem maior potencial para produtividade, com ganhos que podem variar de 30 até 50% (Mueller et al., 2005).

Uma das técnicas mais utilizadas para limpeza de vírus em sementes de alho é a cultura de meristemas associada ao tratamento térmico por calor. Entretanto, apesar de ser bastante utilizada para eliminação de viroses em plantas, percebe-se, no contexto da literatura, que as pesquisas realizadas com o alho, até o presente momento, ainda não permitiram a utilização plena das técnicas da cultura de tecidos na micropropagação para a eliminação de viroses.

Em decorrência disso, os protocolos de limpeza clonal atualmente utilizados apresentam deficiências no que refere-se à quantidade e qualidade da semente produzida, e na garantia da erradicação por completo de complexos virais. Isto, entretanto, pode estar ligado a fatores fisiológicos, ainda não compreendidos nesta espécie, a fatores fitossanitários e a falta de pesquisas direcionadas para o desenvolvimento de metodologias mais eficazes de limpeza clonal. Este trabalho, portanto, está fundamentado na necessidade do aprofundamento de estudos que venham a contribuir para a ampliação das perspectivas da utilização de tecnologias de limpeza de vírus, em favor do desenvolvimento da cultura do alho no Brasil.

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivos: estudos para melhor entendimento da morfogênese do alho e do nível de envolvimento dos fatores ambientais; otimizar os protocolos de micropropagação de alho a partir de meristemas caulinares provenientes

de bulbilhos; estudos do metabolismo de substâncias endógenas através de ensaios bioquímicos e, desenvolver uma nova técnica de limpeza de vírus, mais eficiente, viável técnica e economicamente, e compará-la com os métodos tradicionais de limpeza de viroses.

O trabalho foi apoiado em pesquisas realizadas até o presente, e nos fatores climáticos de maior relevância envolvidos com o desenvolvimento desta espécie em condições de campo e, sempre que possível, associando essas informações com o desenvolvimento das plantas *in vitro*. O estudo está organizado em Capítulos, separados com objetivos específicos.

No Capítulo I, além de uma revisão geral sobre o escopo do trabalho, são caracterizadas as etapas de crescimento do alho “nobre”, em condição ambiental de cultivo prevalescente na região de produção, enfatizando suas fases fenológicas e culturais, e requerimentos climáticos. Foi efetuada também uma descrição da morfogênese da bulbificação, com detalhamento da forma de distribuição dos bulbilhos que compõem o bulbo.

O Capítulo II trata da otimização do protocolo de limpeza de vírus, através da condução de diversos experimentos em laboratório, a saber: seleção de bulbilhos utilizados como doadores de explantes (ápices caulinares); avaliação dos efeitos de tipos e concentrações de reguladores de crescimento de plantas e de carboidratos nas variáveis de crescimento de plantas *in vitro*; avaliação dos efeitos de temperatura e fotoperíodo sobre os parâmetros de crescimento de plantas e de bulbos de alho *in vitro*, bem como os efeitos sobre a diferenciação de gemas que dão origem aos bulbilhos.

No capítulo III foram determinadas as alterações nos níveis endógenos de carboidratos solúveis e do ácido abscísico durante o ciclo de cultivo da planta, em condições de campo e *in vitro*, sendo nesta última, sob condições ambientais variadas. O possível envolvimento dessas substância no processo de indução da bulbificação também foi discutido.

O capítulo IV apresenta uma nova técnica de limpeza de vírus, desenvolvida a partir de um protocolo de criopreservação previamente estabelecido neste trabalho. Foi realizada a comparação da eficiência deste novo método com os tradicionais métodos de limpeza através da avaliação da taxa de sobrevivência e da aplicação de técnicas moleculares e imunoenzimáticas de diagnose de vírus. Ainda neste capítulo, paralelo ao desenvolvimento destas atividades, foi realizado um estudo sobre alterações na estrutura e ultra-estrutura de tecidos e

células do meristema do alho causadas pela criopreservação, e estabelecida uma técnica de imunolocalização de vírus em alho, através de ensaios imunocitoquímico-Imunogold.

Para cada capítulo mencionado, foi realizada uma revisão atualizada dos temas abordados com o referencial teórico e as informações científicas disponíveis até o presente, que serão descritas a seguir.

Referências Bibliográficas

ASSIS, M. I. T.; CARVALHO, M. G. & MACIEL-ZAMBOLIN, E. Detecção de vírus do nanismo amarelo da cebola (OYDV), em clones de alho (*Allium sativum*) mediante dois testes sorológicos. **Fitopatologia Brasileira**, v.18, p. 288. 1993.

BIANCHI, A.; ZAMBONELLI, A.; ZECHINI D'AULERIO, A. & BELLESIA, F. Ultrastructural studies of the effects of *Allium sativum* on phytopathogenic fungi *in vitro*. **Plant Disease**, v.81, p. 1241-1246. 1997.

CENTRO DE SOCIOECONOMIA E PLANEJAMENTO AGRÍCOLA – Síntese Anual da agricultura de Santa Catarina - Epagri/Cepa. **Alho**. Florianópolis, SC, 2011. 315p.

CHEN, Y. W.; ZHENG, H. Y.; ADAMS, M. J.; CHEN, J. P. Serological relationships among the over-expressed coat proteins of *Allexivirus*. **Journal of Phytopathology**, v.156, p.251-255. 2008.

CONCI, V. C., CANAVELLI, A. E.; LUNELLO, P. A. Yield losses associated with virus-infected garlic plants during five successive years. **Plant Disease**, v.87, p.1411-1415. 2003.

DANIELS, J. Ocorrência de vírus em alho no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**: Brasília, DF, v.24, n.1, p.91. 1999.

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

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

FAYAD-ANDRÉ, M. S. **Diagnose, disseminação e efeitos fisiológicos do complexo viral do alho em regiões produtoras do Brasil**. Brasília: Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, 2010, 137 p. Tese de Doutorado.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em:

<http://www.ibge.net/home/estatística/economia/pam/tabela/1pam.shtm>. Acesso em: 26/02/2012.

MASSOLA JR, N. S.; JESUS JR., W. C.; KIMATI, H. Doenças do Alho e da Cebola. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN MELO-FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, p. 53-63.

MOTA, J. H.; NOCE, R.; YURI, J. E.; RESENDE, G. M.; SOUZA, R. J.; Análise da evolução da produção e relação risco-retorno para a cultura do alho, no Brasil e regiões (1991 a 2000). **Horticultura Brasileira**, v.23, p. 238- 241. 2005.

MELO-FILHO, P. **Deteção e caracterização molecular de *Allexivirus* e estudo de degenerescência em plantas de alho (*Allium sativum* L.) provocada por vírus**. Brasília-DF, 2003. 116p.Tese (Doutorado). Universidade de Brasília.

MELO-FILHO, P. A.; NAGATA, T.; DUSI, A. N.; BUSO, J. A.; TORRES, A.C.; EIRAS, M.; RESENDE, R. O. Detection of three Allexivirus species infecting garlic in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p. 375-340. 2004.

MENEZES SOBRINHO, J.A.; Coord. **Instruções técnicas do CNPHortaliças 2**. Brasília: EMBRAPA, 1984. 16P.

MENEZES SOBRINHO, J.A. **Cultivo do alho (*Allium sativum* L.)**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA/CNPH, 1997. 16 p. (Instruções Técnicas, 2).

MUELLER, S.; VIEIRA, R. L.; BIASI, J. Efeito da limpeza de vírus sobre a produtividade de alho em Caçador, SC. **Agropecuária Catarinense**, v.18, p.50-52. 2005.

O’GARA, E. A.; HILL, D. J.; MASLIN, D. J. Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p. 2269–2273. 2000.

PAVAN, M. A.; GUIMARÃES, A. M. ; KAMITSUJI, M. K. ; MATSUMOTO, S. N. Amostragem da incidência de viroses em

cultivares de alho nobre (*Allium sativum* L.) proveniente de regiões produtoras do Estado de Santa Catarina. In: XXII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 1989, São Paulo, SP. **Fitopatologia Brasileira**, v. 14, p. 136-136. 1989.

RESS, L. P.; MINNEY S. F.; PLUMMET, N. T.; SLATER, J. H.; SKYRME, D. A. A quantitative assessment of the antimicrobial activity of garlic (*Allium sativum*). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.9, p. 303-307. 1993.

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

WILSON, C. L.; SOLAR, J. M.; EL GHAOUTH, A.; WISNIEWSKI, M. E. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, v.81, p. 204-210. 1997.

YOSHIDA, S.; KASUGA, S.; HAYASHI, N.; USHIROGUCHI, T.; MATSUURA, H.; NAKAGAWA, S. Antifungal activity of ajoene derived from garlic. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p. 615-617. 1987.

CAPÍTULO I

ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DO ALHO (*Allium sativum* L.)

1. História e Centros de Origem

O centro principal de origem do *Allium sativum* L. permaneceu desconhecido por um longo período, embora seja uma espécie amplamente cultivada desde as primeiras civilizações na Índia, China, Egito, Grécia e Roma, (Ernst, 2007; Brewster, 2008). Os primeiros taxonomistas do alho, como Linnaeus (1753) e Don (1827) consideraram o *A. sativum* como uma espécie mediterrânica. Mais tarde, os trabalhos de Regel (1887), De Candolle (1886), Vavilov (1951) e Kazakova (1971) indicaram que a espécie era original da Ásia Central. Vavilov (1951) propôs a área do Mediterrâneo como um centro secundário de origem. Mais recentemente, um número de plantas férteis de tipos primitivos foram descobertas por Etoh (1986) e Kotlinska et al. (1991) nas montanhas da Ásia Central, reforçando a hipótese de que esta área foi o centro principal de origem do *A. sativum*. Pooler (1991) também sugeriu a Ásia Central como centro de origem da espécie baseado na variabilidade encontrada entre plantas primitivas, estimada por meio de marcadores bioquímicos e moleculares.

Em um estudo mais abrangente, Maaß & Klaas (1995) analisaram 300 clones de alho a partir de vários locais do continente euro-asiático por meio de marcadores moleculares, com o objetivo de se ter um panorama integrado da estrutura do germoplasma de *Allium spp.* e da sua domesticação. Assim, foi proposta uma subdivisão do germoplasma de alho em quatro grupos e um subgrupo: *sativum*, *ophioscorodon*, *longicuspis*, grupo subtropical e subgrupo pekinense (Figura 1). O grupo *longicuspis* foi considerado como o mais primitivo, do qual os outros três grupos foram derivados, e propuseram ainda que o grupo *sativum* foi domesticado na bacia do Mediterrâneo, o grupo *ophioscorodon* na Europa Centro-Oriental e no Cáucaso, e o grupo subtropical na região que engloba a Índia, Vietnã, Mianmar (Birmânia) e Malásia (Maaß & Klaas, 1995).

Uma das razões pelas quais o centro de origem de *A. sativum* não era claro é que as espécies progenitoras eram desconhecidas, e a falta de informação sobre sítios de coleta (original) impossibilitava a correlação dos agrupamentos com a origem geográfica (Zhao et al., 2011). Além

disso, a presumível região de origem, a Ásia Central, foi fechada para pesquisadores estrangeiros por um longo período, dificultando a organização de coletas para estudos dessa natureza.

O alho teve, provavelmente, alta variabilidade no centro primário de evolução, mesmo antes da sua dispersão a partir desta região. Depois disso, a variação intraespecífica deve ter aumentado e o isolamento provavelmente acelerou sua diversificação, presumindo-se assim que reprodução sexual tenha ocorrido fora do centro de origem. Dessa forma, o alho apresenta hoje grande variação nos traços morfológicos, tais como: tamanho de bulbo, forma e cor, sabor e pungência, número e tamanho de bulbilho, arquitetura de bulbos, capacidade de florescimento, altura de plantas, tipo e número de folhas (Zhao et al., 2011).

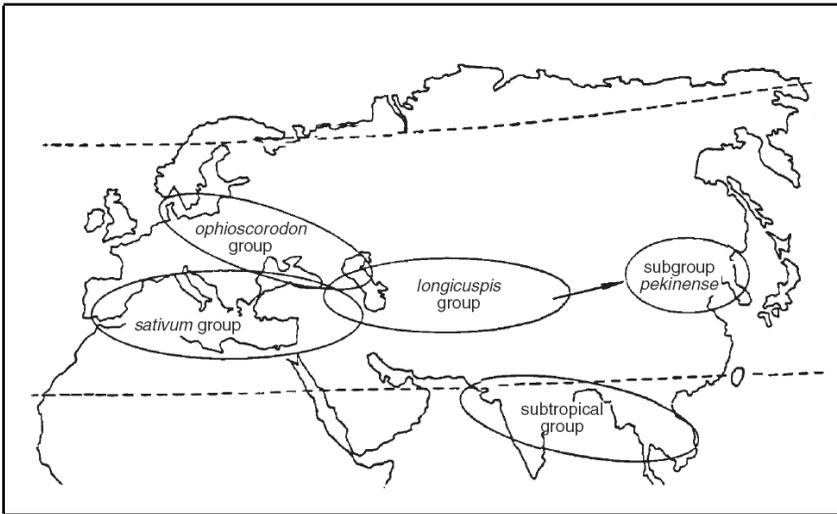


Figura 1 - Distribuição geográfica no continente euro-asiático de vários grupos de alho proposto por Maaß e Klaas (1995).

As relações evolutivas entre *A. sativum* e seus parentes selvagens tem sido pouco investigadas. Contudo, tem sido proposto que a espécie selvagem *A. longicuspis* é a progenitora de *A. sativum*, visto que as duas espécies são similares em relação à morfologia, cariótipo e perfil de isoenzimas, RAPD e AFLP, chegando a ser considerada por alguns autores como a mesma espécie (Etoh & Simon, 2002; Ipek & Simon,

2003; Simom & Jenderek, 2003). O cruzamento entre *A. sativum* L. e *A. longicuspis* produz híbridos férteis e viáveis, o que corrobora para hipótese que de esta última ser a espécie ancestral ou parente mais próximo do atual alho comercial (Etoh & Simon, 2002).

2. Taxonomia e descrição morfológica

A maioria das espécies de *Allium* são diplóides ($2n = 2x = 14, 16$ ou 18). A poliploidia é menos comum, mas ocorre entre variedades botânicas cultivadas de *A. ampeloprasum* ($2n = 4x = 32$ ou $6x = 48$), *A. schoenoprasum* ($2n = 4x = 32$), *A. chinense* ($2n = 4x = 32$) e *A. tuberosum* ($2n = 4x = 32$), bem como em espécies selvagens, tais como *A. babingtonii* ou *A. oreoprasum* (ambos com 48 cromossomas) (Jenderek, 1998). Ocorrem também espécies triplóides ($2n = 3x = 24$) como em *A. schoenoprasum*, *A. Chinense* e *A. trifoliatum* Cyr. var. Kollm estéril (Jones, 1990), e ambos os triplóides e pentaploidess ($2n = 5x = 40$) em *A. ampeloprasum* (Kollmann, 1971, 1972).

O *A. sativum* L. é uma espécie diplóide ($2n = 16$), da família Alliaceae, ordem Asparagales (Brewster, 2008). *A. sativum* é uma planta herbácea com hábito bulbosa, com haste esférica, podendo atingir de 0,40 - 0,80 m de altura (Menezes Sobrinho, 1984; Biasi & Mueller, 1999). Na haste, carrega um grande número de folhas com distintos arranjos de arquitetura. Possui folhas lanceoladas, com o limbo medindo de 0,20 a 0,50 m de comprimento. O pseudocaule é formado pelas bainhas das folhas, as quais se implantam em um caule pequeno e achatado, situado na base do bulbo, denominado disco basal (Burba, 1983). Um bulbo de alho é formado por bulbilhos (dentes), normalmente em números de 4 a 20, dependendo do tipo e cultivar, rodeado por algumas túnicas (bainhas de folhas secas), que correspondem à parte basal da folhagem da planta.

Botanicamente, um bulbilho é uma versão modificada de gemas axilares, originadas na parte basal do interior das folhas (Pooler & Simon, 1993). Na porção inferior do disco basal fica situado o sistema radicular. As raízes formam um sistema radicular do tipo fasciculado, atingindo profundidades desde 10 até 50 cm (Menezes Sobrinho, 1984). As folhas emergem da parte superior do caule, variando de estreitas a largas, podendo a superfície apresentar-se lisa ou com maior cerosidade, e o escapo floral, quando presente, tem sua origem no centro do bulbo (Jones & Mann, 1963).

Alguns clones de alho têm uma tendência para produzir escapo floral. Enquanto outros perderam essa capacidade, alguns apresentam resposta intermediária (pendoamento itermediário). Para os tipos com presença de pendão floral, o meristema apical do escapo diferencia botões florais intercalados com bulbilhos (Ipek et al., 2005). Como ocorre em cebola e em outras espécies de *Allium*, as flores perfeitas de *A. sativum* são compostas por 6 pétalas, 6 anteras e 3 lóculos com 2 óvulos cada (Simon & Jenderek 2003), entretanto, Etoh & Simon (2002) apontam que, mesmo com a presença do escapo floral a maioria das cultivares de *A. sativum* não podem desenvolver flores completamente maduras.

3. Melhoramento e Recursos Genéticos

O método de melhoramento clássico do alho, com a utilização de cruzamentos para ampliar a variabilidade genética e obter novas cultivares, tem sido limitado devido a natureza reprodutiva dessa hortaliça (Brewster, 2008). A propagação do alho tem sido feita assexuadamente por meio de bulbilhos retirados da base da planta, ou por bulbilhos aéreos das inflorescências.

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a esterilidade em *A. sativum*, entre eles estão: a degeneração de órgãos florais por não conseguirem competir com o rápido desenvolvimento de bulbilhos vegetativos aéreos; a degeneração de micrósporos antes da mitose (Kenel et al., 2010); a existência de doenças degenerativas, como as causadas por vírus e micoplasmas, interferindo na reprodução sexual (Jenderek & Hannan, 2004); as anomalias morfológicas encontradas nas flores de alho que ocorreram associadas à esterilidade (Etoh & Ogura, 1977) e a produção de gametas balanceados que estaria sendo reduzida significativamente devido ao acúmulo de aberrações cromossômicas, como aneuploidia, translocação e/ou inversões, dado o fato da espécie ter sido propagada assexuadamente por muitas gerações (Pooler & Simon 1993).

Várias tentativas foram realizadas para o melhoramento do alho através de cruzamentos interespecíficos (Kononkov, 1953; Etoh, 1980, 1985; Kotlinska et al., 1991; Sugimoto et al., 1991; Pooler & Simon, 1993; Etoh & Simon, 2002; Simon & Jenderek, 2003) e por meio de transformação genética, através de bombardeamento de partículas

(Sawahel, 2002) e por transferência de genes mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Kondo et al., 2000; Kenel et al., 2010).

A oportunidade de produzir híbridos interespecíficos entre *A. sativum* e outras espécies tornou-se viável com a descoberta de clones de alho férteis, porém, na maioria das tentativas, foi identificado um elevado nível de esterilidade nos híbridos obtidos, sendo sua utilidade limitada devido à falta de produção de sementes (Pooler & Simon, 1993). Entre os trabalhos já realizados, em média, 80 a 90% das sementes produzidas eram constituídas apenas dos envólucros, sem embrião ou endosperma. A metade das plântulas apresentava-se vigorosas, porém, sofreram anormalidades durante o desenvolvimento, morrendo ainda no estágio inicial (Simon & Jenderek, 2003). Apesar das dificuldades encontradas, a constatação da presença de pólen viável em híbridos de alho, mesmo que em pequena quantidade, levanta a possibilidade de introgressão de parte do genoma entre espécies (Sugimoto et al., 1991; Etoh & Simon, 2002).

No caso da transformação genética, apesar de ser uma ferramenta em potencial para o melhoramento, não se mostrou simples para alho. Um número limitado de calos embriogênicos atingido, o genoma extremamente grande e a presença forte de nucleases endógenas parecem afetar a sua transformação e sistemas de regeneração (Kenel et al., 2010).

O desenvolvimento bem sucedido de um programa de melhoramento para alho, através da reprodução sexual, requer a utilização de uma grande diversidade genética, comum no centro de origem. O mapa de distribuição de *Allium spp.* sugere que as regiões mais adequadas para a coleta estaria nas montanhas das zonas centrais da Ásia, consideradas o habitat natural de um grande número de espécies, incluindo *A. longicuspis*.

Apesar da plasticidade fenotípica apresentada pela espécie *A. sativum*, no Brasil se cultivam basicamente dois grupos de cultivares de alhos: “comuns”, formado por cultivares de ciclo precoce (120 a 149 dias), e “nobres”, formado por cultivares de ciclo tardio (150 a 180 dias), do plantio a colheita dos bulbos, variando conforme a cultivar utilizada (Burba, 1983; Menezes Sobrinho, 1984; Biasi & Mueller, 1999). A classificação das cultivares de alho, quanto ao ciclo de cultivo, é determinada por múltiplas condições edafoclimáticas e de fotoperíodo, causadas principalmente pelas diferenças de relevo e latitude.

As cultivares de ciclo tardio, alvo do presente estudo, de maior valor comercial no mercado brasileiro, superam em produção e

qualidade as de ciclo precoce, porém, são representadas por um grupo reduzido de cultivares, geneticamente muito semelhantes (Vieira & Nodari, 2007). São caracterizadas por produzirem bulbos uniformes, com número de bulbilhos por bulbo variando entre 8 a 15, e por apresentarem a coloração roxa intensa dos bulbilhos, residindo aí o fato de terem uma boa aceitação no mercado consumidor. O termo “nobre” vem destes aspectos, porém, nem todo alho tardio tem qualidades para ser classificado como nobre.

4. Crescimento e desenvolvimento

O clima, em particular a temperatura e o fotoperíodo, tem sido descrito como fator limitante à cultura do alho, condicionando o seu cultivo em função das condições locais (Filgueira, 1992). Embora haja diferença nas condições ambientais ótimas para cada um dos grupos de cultivares citados, podemos generalizar dizendo que, nas regiões do Brasil onde se cultivam o alho, os plantios são realizados durante o outono e o início do inverno, e a colheita realizada desde o início da primavera até o mês de dezembro, de acordo com a região e cultivares consideradas.

Para as cultivares do grupo nobre, a emergência do bulbilho-semente e o desenvolvimento inicial são beneficiados por temperaturas amenas (Garcia, 1984), e o estímulo para bulbificação requer baixas temperaturas seguido de dias longos, enquanto que na fase final de desenvolvimento e maturação do bulbo, temperaturas mais elevadas (Burba, 1983; Biasi & Mueller, 1999). No Sul do Brasil, tais condições são satisfeitas quando o plantio é efetuado entre o final do outono e início do inverno. Sob condições de fotoperíodo longo, e/ou de temperaturas baixas insuficientes, ocorre crescimento vegetativo sem haver formação normal de bulbos e bulbilhos (Biasi & Mueller, 1999).

O cultivo do alho apresenta uma primeira etapa de crescimento, na qual os processos metabólicos e fisiológicos da planta estão orientados a formar o sistema radicular e as folhas (Pooler & Simon, 1993). Normalmente, para as cultivares nobres plantadas no Sul do Brasil, esta etapa se evidencia durante o inverno, mais precisamente durante o mês de julho até meados de setembro. Neste período não há desenvolvimento de bulbo e bulbilhos.

A emissão de raízes da base do bulbilho-semente é uma das primeiras manifestações de crescimento logo após o plantio. Paralelamente, ocorre o crescimento da folha de brotação e os

primórdios de folhas contidas nas gemas localizadas no interior da folha de armazenamento do bulbilho-semente (Burba, 1983). A primeira etapa de crescimento da planta é dependente das substâncias liberadas pela folha de armazenamento, estando, portanto, o crescimento nas primeiras semanas diretamente relacionado com a diminuição do peso seco da semente. O aporte de reservas por parte da semente se mantém durante o período inicial de crescimento da planta e ainda se mantém por algum tempo, quando as plantas já se encontram realizando fotossíntese.

Nas condições ambientais prevalentes nas regiões de cultivo de alho “nobre”, a etapa de crescimento vegetativo se realiza em condições de dias curtos (11 a 12 horas de luz natural) e com temperaturas baixas e em elevação. Os fatores que afetam o desenvolvimento e duração da área foliar e das raízes tem uma influência decisiva no rendimento final do cultivo, pois, segundo Burba & Galmarini (1997), é nesta fase que se dá a formação do aparato fotossintético da planta. Uma vez induzida a bulbificação, para que ocorra o crescimento do bulbo na base da planta é necessário temperatura entre 17 e 26°C (Menezes Sobrinho, 1997 e Biasi & Mueller, 1999), sendo que temperaturas inferiores a 9°C retardam o processo e superiores a 28°C o inibem (Burba, 1983). Na Figura 2 é apresentado um resumo das etapas fenológicas da planta do alho, com fotoperíodo e valores médios mensais de temperaturas diurnas e noturnas dos últimos oito anos, de acordo com cada etapa do desenvolvimento.

4.1. Bulbificação

O hábito de crescimento em forma de bulbo confere ao alho os benefícios da reprodução vegetativa, pelo desenvolvimento de inúmeros bulbilhos formados na base da planta. Trabalhos realizados para o estudo da fisiologia do desenvolvimento de plantas bulbosas do gênero *Allium* são relativamente numerosos (Zing, 1963; Srivastava & Adhikari, 1969, Shah & Kothari, 1973; Arguello et al., 1983; Pooler & Simon, 1993; Burba & Galmarini, 1997; Resende & Souza, 2000; Oliveira et al., 2004). Entretanto, são raros e defasados os trabalhos de pesquisa realizados com *A. sativum* dando ênfase aos aspectos fisiológicos da bulbificação, detalhes da estrutura geral e da anatomia interna do bulbo e de substâncias envolvidas na sua formação. Sobre tais abordagens destacam-se os trabalhos de Mann (1952), Shah & Kothari (1973) e Arguello et al. (1983 e 1986).

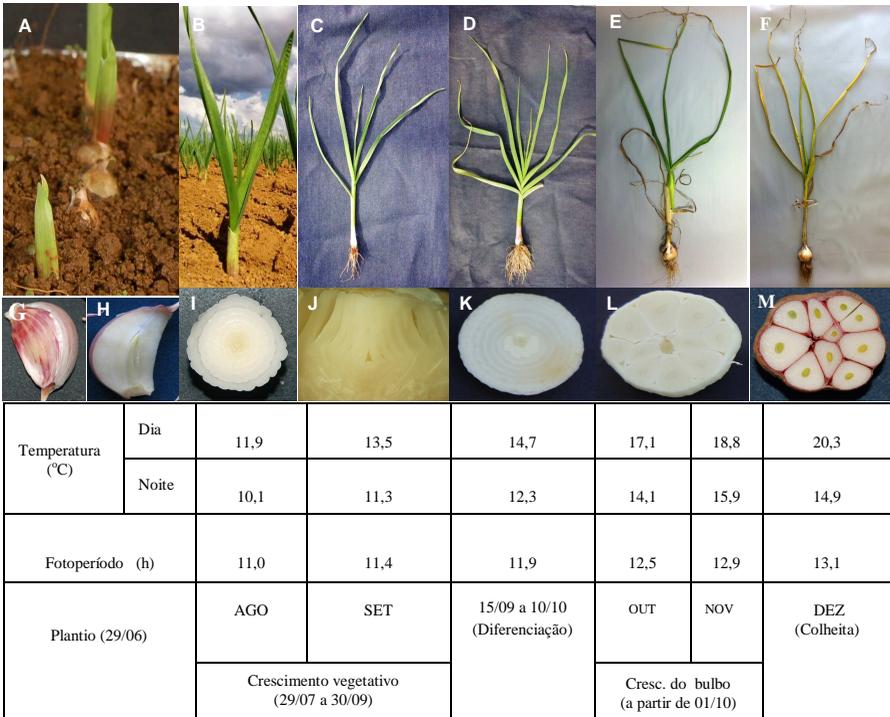


Figura 2 - Etapas fenológicas do alho cv “Jonas”, do plantio a colheita (junho a dezembro), temperatura média mensal (diurna e noturna) e fotoperíodo, de acordo com a fase de crescimento da planta: **A**: emergência dos bulbilhos-sementes; **B-C**: crescimento vegetativo; **D**: período de diferenciação; **E**: crescimento do bulbo; **F**: maturação; **G**: bulbilho semente; **H**: secção longitudinal do bulbilho semente; **I**: secção transversal da base da planta aos 35 dias após o plantio; **J**: secção longitudinal da base da planta aos 60 dias após o plantio; **K**, **L** e **M**: secções transversais do bulbo em diferentes fases do desenvolvimento. Dados de temperatura foram coletados na Estação meteorológica automática da Epagri/EE de Caçador no período de 2004 a 2011. Os valores de fotoperíodo foram estimados segundo metodologia descrita por Espínola Sobrinho (2003).

A bulbificação, em termos gerais, segundo definição de Resende et al. (1995), é o processo fisiológico pelo qual uma seção do caule sofre mudanças bioquímicas e morfológicas para se tornar um órgão de armazenamento. Do ponto de vista morfológico, a primeira etapa da bulbificação em alho consiste na diferenciação de células meristemáticas em gemas vegetativas na inserção de folhas jovens desenvolvidas a

partir do meristema apical, na face superior do disco basal, que mais tarde se transformam em bulbilhos (Pooler & Simon, 1993).

Essa transformação, induzida pelo frio (Mann 1952; Srivastava & Adhikari, 1969; Shah & Kothari 1973; Burba & Galmarini, 1997), pode estar relacionada com mudanças de balanços hormonais endógenos que resultam na mudança de rota dos meristemas de desenvolvimento de folhas expandidas para folhas de reserva (futuros bulbilhos ou dentes) onde serão acumulados os fotoassimilados produzidos pela planta (Arguello et al., 1983 e 1986). De acordo com Burba & Galmarini (1997), essa transformação inclui também a produção de vários primórdios de folhas a partir da gema diferenciada no caule: o primeiro primórdio origina a folha de proteção do futuro bulbilho e o segundo dará lugar à folha de armazenamento. O primórdio seguinte dará origem à folha de brotação com dois a três primórdios foliares envolvendo o meristema apical. O restante dos primórdios dará origem às futuras folhas expandidas da planta.

Quando a planta não encontra condições ambientais favoráveis, ocorre um processo de intumescimento na região entre o pseudocaule e o disco basal, pelo acúmulo de reservas na base das bainhas foliares, resultando na formação de um pseudobulbo. Supõe-se que esse processo seja semelhante ao que ocorre na formação de bulbos de cebola e shallot. De acordo com Abbey & Fordhan (1998), nestas espécies, a formação do órgão de armazenamento ocorre em resposta ao estímulo do fotoperíodo, porém, a indução do seu desenvolvimento não envolve a divisão celular. O processo inicia com o alongamento e entumescimento das bainhas das folhas, provavelmente devido à expansão de células (De Mason, 1990 e Brewster, 1994).

Uma ou mais gemas podem desenvolver-se nas axilas das primeiras folhas de alho, no início do período de crescimento da planta, porém, segundo Mann (1952), a transformação dessas gemas em bulbilhos não ocorre. Essas folhas foram referidas por Shah & Kothari (1973) como "folhas não dentes". Esses autores observaram ainda que, somente as folhas produzidas após o oitavo plastocrono apresentam gemas com capacidade para originar bulbilhos, e essas foram referidas como "folhas dentes". Shah & Kothari (1973) realizaram seu trabalho utilizando variedades de alho procedentes da Ásia e Europa, e nele relatam que, em geral, um bulbo de alho pode desenvolver de 8 a 12 folhas não dentes, metade das quais secam precocemente, seguido de 5 a 8 folhas dente (folhas que formam bulbilhos nas suas axilas). Estes autores afirmam, entretanto, que folhas com ou sem a presença de

bulbilhos na sua base, são semelhantes em morfologia e desenvolvimento.

Conforme relatado anteriormente um bulbilho formado a partir de uma gema axilar dormente, contém um meristema apical, rodeado por três folhas modificadas - uma fina folha periférica de proteção, uma folha de armazenamento (ou de reserva), e uma folha de brotação. É uma organização morfológica bastante simples, mas fisiológica e bioquimicamente complexa (Pooler & Simon, 1993). Na Figura 3 é apresentada com detalhes a estrutura de um bulbilho de alho maduro.

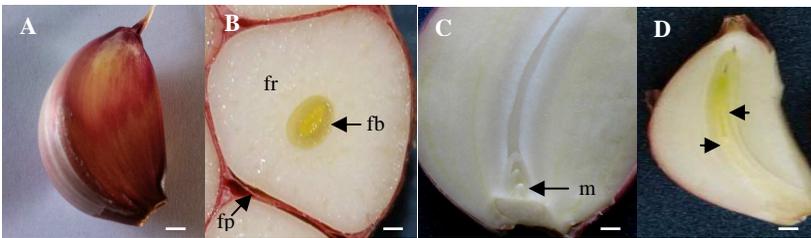


Figura 3 - Estrutura do bulbilho de alho. **A**, aspecto geral do bulbilho inteiro. **B**, secção transversal do bulbilho indicando detalhes da estrutura interna; fp: folha de proteção; fr: folha de reserva; fb: folha de brotação. **C**, secção longitudinal do bulbilho indicando a posição do meristema apical (ma) envolto pela bainha da folha de brotação. **D**, folha de brotação com primórdios desenvolvidos (setas). Barras: A e E = 0,5 cm, B e C= 1 cm. Caçador, SC, 2011.

A folha de proteção do bulbilho apresenta uma superfície dura lignificada, sendo uma barreira à penetração de pragas e doenças, e abrange a folha de reserva que constitui a maior porção do bulbilho. No bulbilho de alho, quase todo o suprimento de reserva que será consumido durante o processo de crescimento inicial é armazenado em uma única folha, a folha de reserva. Como indicado na Figura 3B, esta folha ocupa aproximadamente 90% do tamanho total do bulbilho, é extremamente modificada na forma, bem como em função. Ela consiste quase que inteiramente de bainha, é tubular em forma, e envolve o desenvolvimento da folhagem da planta. No entanto, sua atividade funcional após o plantio é diminuída na medida em que são esgotadas suas reservas, posteriormente ocorrendo o seu apodrecimento. Isto ocorre normalmente de 5 a 7 semanas após o plantio, dependendo do tamanho do bulbilho-semente, que define a quantidade de reservas.

A folha de brotação (Figuras 3B e 3D) consiste de uma bainha que rodeia completamente os primórdios funcionais que envolvem o meristema apical, sendo caracterizada por tecidos extremamente vacuolizados que isolam fisiologicamente o meristema, conseguindo, assim, com que mantenha sua potencialidade morfogenética (Pooler & Simon, 1993).

Em cultivares de alho do grupo “nobre”, o início da bulbificação pode ser visualizado após 12 a 15 semanas do plantio, dependendo da cultivar utilizada e do clima. No entanto, para evidenciar o início do processo com maior precisão, ou seja, a diferenciação de células e a formação de gemas nas axilas de folhas seriam necessários estudos mais detalhados sobre a histodiferenciação em bulbos. Em trabalho disponível na literatura abordando este contexto, Shah & Kothari (1973) observaram em microscopia de luz uma ligeira projeção côncava, como uma gema propriamente dita, na axila de um primórdio foliar. Esta protuberância, segundo os autores, desenvolve-se devido a repetidas divisões periclinais e anticlinais e que, durante o início, a posição da gema no meristema é lateral, posicionando-se mais tarde para a axila da folha.

A gema de um meristema se transforma diretamente em um bulbilho, ou pode aumentar e tornar-se um complexo de gemas (gemas acessórios) dando origem a vários dentes, processo denominado agronomicamente de superbrotção (Burba, 1983 e 1993). No entanto, a ocorrência da origem de desenvolvimento de um ou mais bulbilho por gema poderá ser verificado somente após a formação da folha de proteção.

No presente trabalho, para efeito de comparação, descreveram-se aspectos morfológicos de bulbos de alho representantes dos dois grupos de cultivares plantadas no Brasil (Figura 4). Para esse objetivo, realizaram-se contagens de folhas expandidas em plantas dos dois grupos de cultivares de alho para a identificação do número de folhas com presença e ausência de gemas de bulbilhos em suas axilas.

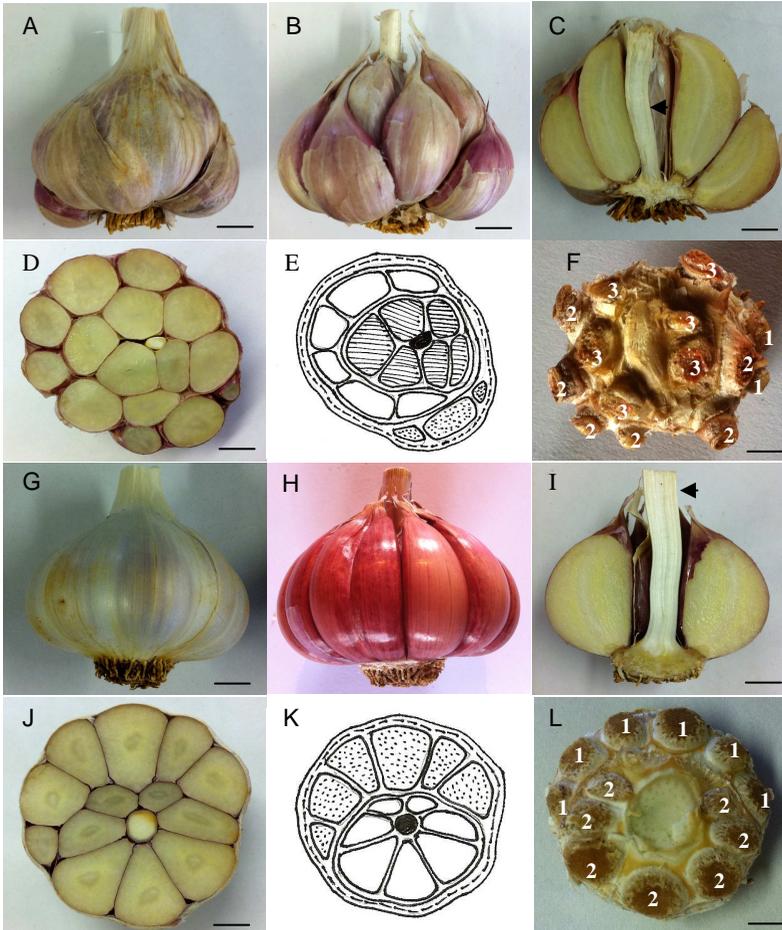


Figura 4 - Estrutura de bulbos de alho do grupo comum (A a F) e do grupo nobre (G a L). Aspectos gerais de uma cultivar de alho do grupo comum (A a C) e do grupo nobre (G a I). Presença de haste floral são indicadas em C e I por seta preta. D e J, secção transversal do bulbo mostrando a morfologia dos bulbilhos (dentes). F e L, projeções do caule onde os bulbilhos estavam presos numerados na ordem do agrupamento dos dentes na base da folha, a partir da folha mais externa. (todos os bulbilhos comum a uma mesma folha recebeu o mesmo número). E e K, uma projeção da imagem de D e J, respectivamente, mostrando a folhagem ao redor dos grupos de bulbilhos. Barras: A, B, C, D, G, H, I, J (1 cm); F, L (0,3 cm). Caçador, SC, 2011.

O trabalho foi realizado durante o ciclo de desenvolvimento de plantas dos dois grupos cultivadas na área da Epagri-Estação Experimental de Caçador. A contagem deu-se a partir da bainha da primeira folha emergida do interior da folha de reserva do bulbilho-semente, até a última folha desenvolvida, iniciando-se no plantio até a 18ª semana, ocasião em que a planta encontra-se totalmente desenvolvida. A contagem procedeu-se a cada semana, amostrando-se três plantas por época. O número total de folhas e o número de folhas que produziram bulbilhos em suas axilas foram calculados pela média das contagens realizadas durante o período de coleta.

Neste estudo, optou-se por designar folhas férteis e folhas estéreis, aquelas que produzem ou não gemas de bulbilhos em suas bases, respectivamente. Constatou-se que a maioria das características morfológicas de bulbos de alho cultivados no Brasil diverge dos alhos cultivados em outras regiões do mundo. Particularmente, nas cultivares do grupo “nobre” utilizadas no Brasil, o processo de formação de bulbo difere das cultivares de alho avaliadas em dois estudos anteriores por Mann (1952) e Shah & Kothari (1973). No presente trabalho, observou-se que um típico bulbo de alho “nobre” apresenta cerca de 9 folhas estéreis, das quais, metade são perdidas durante o ciclo de crescimento da planta e pela manipulação do bulbo colhido, e duas folhas férteis, com o desenvolvimento de 8 a 14 bulbilhos por bulbo (Figura 4 J,K,L).

Mann (1952) constatou a presença de 6 a 8 folhas férteis nas cultivares de alho precoces e tardias procedentes de diversas regiões dos Estados Unidos da América do Norte, sendo que cerca da metade delas continha 2 ou 3 bulbilhos cada. Entretanto, no que se refere a forma de distribuição dos bulbilhos no bulbo, foram detectadas semelhanças entre as cultivares do grupo comum do Brasil e as cultivares precoces avaliadas pelos respectivos autores.

As diferenças relacionadas à formação de bulbo entre as cultivares comuns e nobres plantadas no Brasil são evidentes. Os principais aspectos morfogenéticos de importância na origem e desenvolvimento do bulbilho de alho detectados nos dois grupos de cultivares são: (a) ausência de indução de gemas axilares (dente), nas primeiras folhas expandidas, cerca de 9 folhas em cultivares nobres, e até 12 folhas em cultivares comuns, (b) desenvolvimento de apenas duas folhas férteis nas cultivares nobres, com desenvolvimento de até 7 gemas por folha, e de 3 a 4 folhas férteis em cultivares de alho comum, com desenvolvimento de 3 a 6 gemas por folha, e (c) aspectos morfológicos

do bulbo distintos são observados entre os grupos de cultivares analisados.

O envolvimento de fatores hormonais na organização do meristema axilar está implicado, como a estimulação da formação de gemas pela presença de citocinina, reportada por Arguello et al. (1983 e 1986). Até que ponto o início do meristema do dente (bulbilho) é dependente do estímulo do fotoperíodo e sua reação com a função de reguladores de crescimento, se houver, deve ser experimentalmente investigada. Como o surgimento de gemas de bulbilhos em cultivares de alho do grupo nobre se deu a partir do oitavo plastocrono e diminuiu no último, o equilíbrio de qualquer sistema hormonal que desencadeia variadas situações morfogênicas parece ser influenciado pelos estágios de desenvolvimento da planta, duração do dia e temperatura.

4.2. Desenvolvimento de dormência

Até o início da década de 1980, os pesquisadores da cultura de alho no Brasil não consideravam em seus trabalhos a dormência dos bulbos como um parâmetro importante (Ferreira et al., 1986), e os resultados se limitavam às fases vegetativas até a produção comercial. Entretanto, a cultura passa por sucessivas condições fisiológicas e culturais (Figura 5), sendo que as mudanças que ocorrem no bulbilho durante a bulbificação, a senescência e também durante o armazenamento, são acentuadamente influenciadas pelas condições ambientais. A aplicação de temperaturas baixas, em pré-plantio dos bulbilhos, pode modificar o balanço a favor dos fitohormônios promotores de crescimento (auxinas, citocininas e giberelinas) e contra os inibidores (ácido abscísico e/ou compostos relacionados) levando o bulbilho à brotação precoce (Rakhimbaev & Solomina, 1980; Braz et al., 1997). A biossíntese de giberelinas, por exemplo, pode ser fortemente regulada por fatores ambientais, como fotoperíodo e temperatura, os quais podem alterar os níveis de giberelinas biotivas por afetarem passos específicos da rota biossintética (Guerra, 2004). O efeito do frio em pré-plantio serviria então de gatilho para modificar balanços hormonais.

Um conceito generalizado define a dormência do alho como o estado no qual o crescimento da folha de brotação é temporariamente suspenso, não podendo ser definida como repouso, pois, na prática, se manifesta como um processo dinâmico de mudanças lentas, graduais e

permanentes (Arguello et al., 1986). Nos bulbos e tubérculos, assim como nas sementes, a dormência é decorrente de interações entre substâncias promotoras e inibidoras do crescimento (Thomas, 1981; Sato et al., 2001), sendo que o papel exato destes hormônios não é ainda bem definido (Xu et al., 2006).

O controle do equilíbrio entre substâncias promotoras e inibidoras do crescimento é altamente complexo (El Motaz Billan et al., 1971). De acordo com Xu et al. (2006), substâncias localizadas em diferentes tecidos, associadas a diferentes sistemas do bulbo, determinam o comportamento altamente específico, o que tem levado muitos pesquisadores a confundirem esses comportamentos, como sendo causas distintas de dormência. Luckwill (1952), citado por Amen (1968), foi o primeiro a lançar a teoria unificadora da dormência, englobando todas as possíveis causas como diferentes facetas de um mesmo sistema.

A dormência em alho pode ser dividida em três estágios: pré-dormência, dormência propriamente dita e pós-dormência, como ilustrado no diagrama da Figura 5.

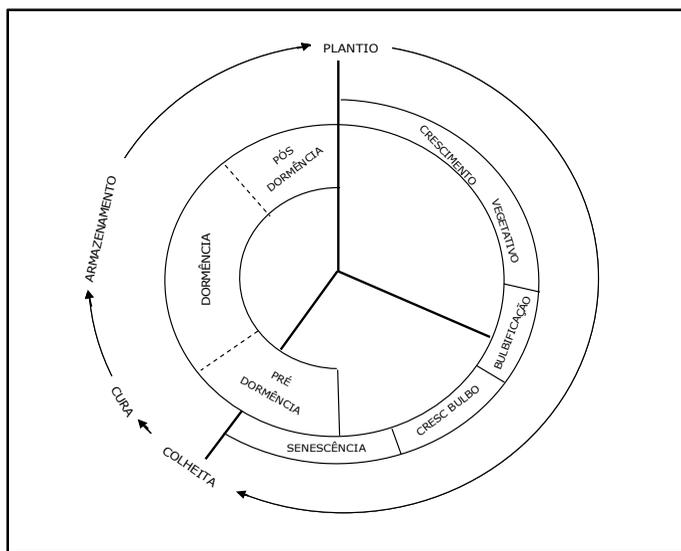


Figura 5 – Diagrama das etapas culturais e da fisiologia da planta de alho, adaptado de Ferreira et al. (1986).

O primeiro estágio fisiológico da dormência é controlado fundamentalmente por fatores externos e os relacionados com as últimas

etapas do cultivo antes da colheita; o segundo é devido exclusivamente a fatores internos, e o terceiro estágio, a pós-dormência, novamente é controlada pelas condições ambientais externas do ambiente (Ferreira et al., 1986).

A duração da dormência pode ser mais ou menos longa, variando com a cultivar ou clone, com as condições ambientais de crescimento, com as temperaturas de armazenamento, com o tamanho do bulbilho e sua posição no bulbo e com todos os fatores que afetam a senescência do bulbo mãe (Carvalho et al., 1980). De acordo com Burba (1983), existe uma correlação entre a duração do período de dormência e os requerimentos de frio e de comprimento de dia para a formação do bulbo. De fato, tem se verificado a campo que, cultivares de dormência curta, como é o caso de cultivares pertencentes ao grupo precoce (comum), possui baixo requerimento, ocorrendo o inverso com as cultivares do grupo tardio (nobre), de dormência prolongada.

4.3. Vernalização

Por dependência, principalmente, de temperaturas apropriadas para o desenvolvimento do bulbo, as cultivares de alho do grupo “nobre” têm seu cultivo normal dificultado em várias regiões do Brasil, inclusive nas regiões mais quentes. No entanto, vários estudos têm mostrado que, a exposição dos bulbilhos a temperaturas de zero a 10°C em câmaras frigoríficas, prática denominada de vernalização, por períodos que podem variar de 30 a 60 dias, dependendo da região onde se pretende produzir, substitui a principal exigência climática dessa espécie, estimulando a bulbificação e viabilizando o cultivo dessas cultivares em regiões com condições climáticas adversas (Aoba & Takagi, 1971; Carvalho et al., 1980; Ferreira et al., 1986; Biasi & Mueller, 1999; Yuri et al., 2005).

Entre os primeiros trabalhos que citam o uso da vernalização de bulbilhos de alho no pré-plantio, 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 frigorificados 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. Sob condições semelhantes, Carvalho et al. (1980), observaram produção de bulbos de

peso médio inferior aos obtidos nos tratamentos sem frigorificação com a cultivar “Amarante”.

Normalmente, plantas provenientes de bulbilhos-sementes não vernalizados, só bulbificam quando recebem condições fototermoperiódicas adequadas, ao passo que, plantas provenientes de bulbilhos vernalizados no pré-plantio iniciam o processo de bulbificação mais rapidamente sob temperaturas elevadas do que sob temperaturas baixas. Esse comportamento, segundo Burba (1983), sugere que no processo de bulbificação existiriam duas etapas: uma indutiva, na qual o frio e/ou os dias longos seriam fatores imprescindíveis (efeito qualitativo) - já que a ação de pelo menos um deles se faz obrigatória para que a bulbificação se manifeste - e outra morfogênica, em que as condições fototermoperiódicas só são capazes de modificar a velocidade do processo (efeito quantitativo). A primeira etapa seria favorecida por temperaturas baixas e/ou dias longos e a segunda, por temperaturas altas e/ou dias longos.

Como regra geral, tem sido considerado que, para que ocorra a indução do processo de bulbificação nas cultivares de alho “nobre” plantadas no Brasil, é necessário um período de frio no primeiro terço do ciclo de cultura (pelo menos um mês) para quebra da dormência de meristemas localizados na inserção de primórdios foliares sobre o caule da planta, e um fotoperíodo de dias longos na sequência. Na região do planalto catarinense foi observado que as temperaturas ótimas para induzir a bulbificação em alho nobre estão entre 5 e 12°C, e a duração do período varia com a temperatura e a cultivar, antecipando a bulbificação na medida em que se aumenta o tempo de exposição da planta à baixa temperatura (Mueller et al., 2005).

5. Aspecto fitossanitário na cultura do alho

5.1. Complexo viral do alho

Depois dos fungos, os agentes virais destacam-se como problemas fitossanitários da cultura do alho, em razão dos eficientes mecanismos de disseminação, via bulbilhos-semente e/ou por ácaros e insetos, principalmente afídeos, e sendo uma espécie propagada vegetativamente, favorece o acúmulo de vírus. Como efeito da infecção, a planta de alho geralmente apresenta-se com menor desenvolvimento, característica do baixo vigor vegetativo com a redução no tamanho da

planta, menor peso dos bulbos e bulbilhos produzidos, reduzindo a longevidade dos bulbos armazenados (Resende et al., 1995).

Os vírus de alho encontram-se distribuídos em três gêneros: *Potyvirus*, *Carlavirus* e *Allexivirus* (Dovas et al., 2001; Fajardo et al., 2001; Shibolet et al., 2001; Conci et al., 2002; Koo et al., 2002; Takaki et al., 2005; Melo Filho et al., 2006). A Tabela 1 apresenta um resumo das espécies já caracterizadas no mundo e seus respectivos vetores.

Tabela 1. Principais espécies de vírus encontradas associadas à cultura do alho, gêneros correspondentes e seu grupo vetor.

Espécie	Acrônimo	Gênero	Vetor
<i>Leek yellow stripe virus</i>	LYSV	<i>Potyvirus</i>	áfídeos
<i>Onion yellow dwarf virus</i>	OYDV	<i>Potyvirus</i>	áfídeos
<i>Garlic common latent virus</i>	GCLV	<i>Carlavirus</i>	áfídeos
<i>Garlic mosaic virus</i>	GarMV	<i>Carlavirus</i>	áfídeos
<i>Garlic mite-borne filamentous virus</i>	Gar MbFV	<i>Allexivirus</i>	ácaros
<i>Garlic virus A</i>	GarV- A	<i>Allexivirus</i>	ácaros
<i>Garlic virus B</i>	GarV- B	<i>Allexivirus</i>	ácaros
<i>Garlic virus C</i>	GarV- C	<i>Allexivirus</i>	ácaros
<i>Garlic virus D</i>	GarV- D	<i>Allexivirus</i>	ácaros
<i>Garlic virus E</i>	GarV- E	<i>Allexivirus</i>	ácaros
<i>Garlic virus X</i>	GarV- X	<i>Allexivirus</i>	ácaros
<i>Shallot virus X</i>	ShV- X	<i>Allexivirus</i>	ácaros
<i>Garlic mite-borne latent virus</i>	GarMbLV	<i>Allexivirus</i>	ácaros
<i>Onion mite-borne latent virus</i>	OMbLV	<i>Allexivirus</i>	ácaros
<i>Shallot mite-borne latent virus</i>	ShMbLV	<i>Allexivirus</i>	ácaros

Fonte: Adams et al. (2004), ICTVdb (2010), Plant Viruses Sequences (2010).

O plantio de cultivares de alho infectadas por viroses parece constituir regra geral nos campos de cultura das principais regiões produtoras do Brasil. Dusi et al. (1994), em levantamento através de microscopia eletrônica imuno específica com decoreação de partículas virais, avaliaram grande número de amostras de alho provenientes de regiões produtoras dos Estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Ceará, Goiás, Distrito Federal e Santa Catarina. Todas as amostras analisadas encontravam-se infectadas por pelo menos dois dos quatro vírus

testados. Os *Potyvirus Onion yellow dwarf virus* (OYDV) e *Leek yellow stripe virus* (LYSV), e o *Carlavirus Garlic common latent virus* (GCLV) foram detectados em 76%, 56% e 64% das amostras, respectivamente. Sementes de cultivares de alho “nobre”, provenientes das regiões produtoras de Santa Catarina, foram amostradas para incidência de viroses por Pavan et al. (1989). Estes autores observaram que 100% das amostras estavam infectadas com pelo menos um vírus, o LYSV. Em estudo mais recente, Fayad-André (2010) fez um levantamento da ocorrência das espécies do complexo viral em cinco regiões produtoras de alho no Brasil. De modo geral, os *Potyvirus* OYDV e LYSV foram prevalentes em quatro regiões, inclusive na região produtora de alho “nobre” no Sul do Brasil.

Em folhas de alho é fácil observar estrias de cor verde claro ou amarelo, e esta sintomatologia é conhecida como “mosaico do alho” (Melo Filho et al., 2004), como ilustrado na Figura 6. Ela é provocada por um conjunto de vírus de características morfológicas e biológicas muito semelhantes, entre os quais, os *Potyvirus* OYDV e LYSV e o *Carlavirus* GCLV, transmitidos por afídeos, principalmente os pulgões, (Silva et. al., 2002). Complexos de vírus como estes, detectados em alho, não ocasionam a morte das plantas e convivem com ela de forma crônica, perpetuando-se através de distintos ciclos de cultivo, ajudado pela natureza agâmica da espécie (Gama & Ávila, 1998).



Figura 6. Plantas de alho cultivar ‘Jonas’ livre de vírus (A) e apresentando sintomas do complexo “mosaico do alho” (B).

Siqueira et al. (1996) hipotetizaram que a superioridade do alho sadio frente ao infectado e sua capacidade de reinfecção parecem depender do “background” genético de cada material. Ainda segundo estes autores, provavelmente, ao longo dos anos, o alho sofreu seleção no sentido de estabelecer mecanismos genéticos, fisiológicos e bioquímicos de equilíbrio entre as viroses e a espécie de maneira a assegurar sua sobrevivência. Os indivíduos suscetíveis seriam gradativamente eliminados, mantendo-se somente aqueles com algum nível de tolerância. Dessa forma, o alho perdeu parte de seu potencial produtivo pela convivência necessária com os patógenos sistêmicos, havendo diferentes respostas de acordo com o “background” genético de clones existentes.

As diferentes viroses do alho podem induzir sintomas foliares semelhantes ou, ainda, serem assintomáticas. Dessa forma, os sintomas pouco auxiliam na identificação dos vírus, sendo, portanto, necessários a diagnose através de técnicas sorológicas e/ou moleculares, e estudos comparativos do crescimento e produção entre plantas obtidas através de cultura de meristemas e pelo sistema convencional, para fornecer um diagnóstico mais preciso dos danos causados pelos vírus. No Brasil, a plena produtividade das cultivares de alho ainda é desconhecida, já que dados referentes à recuperação de plantas livre de vírus e à avaliação da produtividade ainda são escassos.

5.2. Infecção de plantas por vírus

A infecção sistêmica de plantas por vírus envolve três etapas: replicação viral na célula inicialmente infectada, movimento célula a célula (curta distância) e movimento sistêmico (longa distância), geralmente através do floema (Zerbini et al., 2001). Em todas essas etapas, as proteínas codificadas pelos vírus devem interagir com proteínas do hospedeiro, a fim de executar suas funções e permitir o sucesso da infecção viral (Deon et al., 1992).

A capacidade de determinada proteína viral interagir com proteínas de determinada espécie vegetal é um dos fatores determinantes da gama de hospedeiros de um vírus, entretanto, enquanto as interações de proteínas do hospedeiro com as replicases virais parecem ser pouco específicas (Kitajima, 1969), o oposto ocorre com as interações envolvendo proteínas virais responsáveis pelo movimento.

Segundo Deon et al. (1992), essa observação é decorrente de estudos de replicação viral em protoplastos, quando se observa que

muitos fitovírus são normalmente capazes de se replicar em protoplastos de espécies de plantas que não permitem o estabelecimento de infecção sistêmica. Dessa forma, ainda de acordo com os autores, pode-se supor que a restrição ao movimento, e não à replicação, vai determinar o sucesso ou o fracasso da infecção de determinada espécie de planta por determinado fitovírus. Zerbini et al. (2001) relataram que esse fato demonstra a importância do estudo dos processos envolvidos no movimento célula a célula e a longa distância de fitovírus, pois novas formas de controle de doenças virais podem surgir à proporção que esses processos sejam elucidados.

5.3. Diagnose

Quando comparado à outros tipos de patógenos, os vírus são bem mais difíceis de serem diagnosticados, por uma série de motivos. O principal deles está relacionado com a concentração de partículas virais no tecido vegetal, que geralmente varia de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta, exigindo o emprego de métodos de alta sensibilidade (Fajardo, 2001). Desse modo, a escolha do método a ser empregado para diagnose dos vírus depende de uma série de fatores, como o número de amostras a ser analisado, a infra-estrutura do laboratório que irá processar as análises e, principalmente, o tipo de vírus e sua provável concentração (Conci, 1997). De acordo com Daniels (1977), é aconselhado combinar a maior especificidade, sensibilidade e confiabilidade com a facilidade de se realizar as análises.

Até os anos 80, as opções de escolha de diagnose de vírus em plantas eram bastante limitadas, e tinham como método mais sofisticado o sorológico ELISA (Barrocas et al., 2009) que foi desenvolvido por Clark e Adams (1977), na sua primeira versão *Double antibody sandwich* (DAS). Apesar de ser um método bastante sensível e de fácil aplicabilidade, os antissoros para a maioria dos vírus que infectam o alho são poucos disponíveis, em razão de alguns fatores básicos como, a ausência de anticorpo específico de alta qualidade, ausência de caracterização de viroses que ocorrem em alho e de controles negativos adequados (Dusi, 1994).

O Dot-Blot (DB), uma prova sorológica baseada no ELISA, tem se mostrado 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. Sua aplicação tem sido constante para detecção de viroses

em plantas de alho (Dusi et al., 1994; Fayad André, 2010) e em batata (Daniels, 1999).

Dentre as técnicas moleculares a PCR (para vírus de DNA) e RT-PCR (para vírus de RNA) são as mais aplicadas, pela sensibilidade, especificidade e facilidade de realização em laboratório (Barrocas et al., 2009). Essas técnicas baseiam-se no uso de um par de oligonucleotídeos complementares a uma dada região do genoma viral, que são desenhados para gerar um fragmento de DNA de tamanho pré-determinado, com o auxílio de uma enzima termoestável, como a Taq DNA polimerase (Barrocas et al., 2009). Quando o vírus é de RNA, a reação de PCR é feita com o DNA complementar ao RNA viral (RT-PCR), obtido com o auxílio de uma transcriptase reversa (Zerbini et al., 2001). Segundo Fajardo (2002), a técnica RT-PCR (transcriptase reversa da reação em cadeia da polimerase) é uma variação da técnica de PCR e, atualmente, é uma das técnicas mais utilizada na detecção de viroses em plantas de diversas espécies, incluindo o alho.

5.4. Micropropagação do alho e limpeza de vírus

Trabalhos relatam o uso da micropropagação de *Allium sativum* com objetivos diversos, tais como: conservação de germoplasma (Niwata, 1995; Makowska et al., 1999; Keller, 2002; Ellis et al., 2005), estudos sobre embriogênese somática (Myers & Simon, 1998; Fereol et al., 2002;) e transformação genética (Barandiaran et al., 1999; Myers & Simon, 1998; Kenel et al., 2010). Entretanto, a limpeza clonal através da cultura de meristema é, sem dúvida, a técnica de cultura de tecidos vegetais mais regularmente aplicada a essas espécies.

O ápice caulinar tem sido bastante utilizado tanto para a limpeza de vírus quanto para a micropropagação, no entanto, a pequena dimensão e o desbalanço hormonal na região de tecidos meristemáticos acarretam grande dificuldade de obtenção do explante e a regeneração das plantas, tendo sido estas apontadas como limitações da técnica (Torres et al., 1998; Parmessur et al., 2002). A adequação da técnica de limpeza de vírus está então condicionada à obtenção de meristemas apicais reduzidos, sendo recomendados tamanhos entre 0,1 a 0,3 mm (Grattapaglia & Machado, 1990; Torres et al., 1998). Normalmente os índices de sucesso são baixos e o processo é trabalhoso e lento.

Há uma série de fatores que influenciam a indução e crescimento de órgãos de armazenamento *in vitro*. Estes podem ser amplamente divididos em: (1) composição genética da planta (2) condições culturais,

(3) suplementos adicionados ao meio de cultura, e (4) condições ambientais. A constituição genética da planta depende da família, e esta, principalmente, determina o tipo de explante que é mais comumente usado (Ascough et al., de 2008). Por exemplo, explantes foliares de *Amaryllidaceae* e *Iridaceae* não são responsivos em meio de cultura, assim escamas e rebentos são utilizados, respectivamente (Medina et al., 2009). Desde que um explante apropriado foi escolhido, a orientação em relação ao local do explante na planta, e o momento da excisão, são fatores adicionais a serem considerados.

Formulação salina, reguladores de crescimento vegetal (tipo, concentração e proporção) e hidratos de carbono (tipo e concentração), são suplementos do meio de cultura que podem ser ajustados para a indução de órgãos de armazenamento em uma espécie em particular (Medina et al., 2009). A sacarose é considerada a melhor fonte de carbono para cultura de tecidos de plantas *in vitro* (George & Sherrington, 1984), entretanto, apesar da eficiência comprovada na formação de órgão de reserva *in vitro*, poucos estudos tem sido dedicados para avaliar seus efeitos e o de outras fontes de carboidratos na formação de bulbos em plantas de alho cultivadas *in vitro*.

Além da rotineira utilização do ácido naftalenoacético (ANA) e 6-benzilaminopurina (6-BAP), outros reguladores de crescimento já foram utilizados com êxito em meios de cultura para regeneração de alho e outras espécies bulbosas, tais como: TDZ (Rossi et al., 1995), 2iP (Ravnikar et al., 1993; Zel et al., 1997; Torres et al., 2000), Ácido Jasmônico (AJ) (Dermastia et al., 1994; Zel et al., 1997) e ABA (Kim, 1994; Yamasaki et al., 1999). Considerado substância promissora na cultura de tecidos de plantas, o AJ estimula a divisão e alongamento celular (Dermastia et al., 1994) e tem a capacidade de interagir com outras substâncias de crescimento vegetal, como por exemplo, as citocininas (Takashi et al., 1994). Quando é adicionado ao meio de crescimento de plantas em concentrações até 10 μM , pode estimular significativamente o alongamento de gemas axilares, desenvolvimento de raízes adventícias em segmentos nodais e divisão celular em culturas de protoplastos (Ravnikar et al., 1993).

As condições de ambientais, tais como temperatura e luz desempenham um papel fundamental no ambiente da cultura de tecidos, influenciando muitas respostas das plantas cultivadas, como um regulador natural da morfogênese e do crescimento de plantas (Figueiredo-Ribeiro et al., 2004). A luz interfere na qualidade das plantas durante o processo de aclimatização (Braga, 2006), influi na

regulação da morfogênese e atua como fonte de energia para a realização de fotossíntese (Silva, 2005).

Tem sido relatado três categorias de resposta da planta ao fotoperíodo no que diz respeito à formação de órgãos de armazenamento, são estes: indução de órgãos de reserva inibida pela ausência de luz, indução de órgãos de reserva promovida pela ausência de luz, e finalmente, indução de órgãos de reserva por ambos, luz e escuro (Niimi & Onozawa, 1979; Kim et al., 1981; Steinitz & Yahel, 1982; Jacobs et al., 1992; Slabbert & Niederwieser, 1999; e Ascough et al., 2008).

Foi estabelecido que tuberização em batata (*Solanum tuberosum*) ocorre mais cedo em dias curtos do que longos, com a possibilidade de o início da tuberização ser mais abrupta sob essa condição (Gopal et al., 1998; Sidikou et al., 2003; Allemann & Hammes 2006). Para algumas cultivares o fotoperíodo curto pode atuar como um agente permissivo para tuberização (Seabrook et al., 1993). Em geral, a aplicação de um termoperíodo com uma temperatura baixa durante a noite e dias curtos também aumentou a produção de microtubérculos de *Xanthosoma sagittifolium* (Tsafack et al., 2009). Resultados similares também foram observados em batata, onde uma temperatura noturna baixa combinada com dias curtos promoveu um processo de tuberização rápido e sincronizado (Charles et al. 1993).

No atual processo de limpeza clonal do alho distinguem-se duas fases: a primeira é realizada no laboratório para o estabelecimento da cultura *in vitro* e microbulbificação; a segunda fase é realizada em telados anti-afídeos, onde as plantas matrizes obtidas de cultivos *in vitro* são mantidas durante dois ciclos de produção para multiplicação e indexação de vírus (Figura 7).

Como relatou-se anteriormente, plantas de alho cultivadas no campo sob condição ambiental desfavorável, são incapazes de diferenciar células localizadas nas axilas de folhas-dentes e, conseqüentemente, formar bulbos constituídos por bulbilhos (bulbo completo). Na micropropagação, além dessas dificuldades, outras limitações têm sido freqüentes no atual sistema de produção, e mencionadas como empecilhos à regeneração de plantas de alho. Uma delas, de ordem fisiológica, refere-se a qualidade da semente produzida na fase de laboratório.

O teor de massa seca do microbulbo-semente produzido *in vitro*, definido por seu peso seco, e que constitui as reservas nutricionais da semente, influencia diretamente no vigor da planta na próxima geração

e, na indução e desenvolvimento do bulbo formado na base dessa planta. De fato, tem-se constatado na prática que na maioria das vezes, bulbos pequenos e/ou com poucas reservas, obtidos por cultura de meristemas, quando plantados no solo, tendem à formar bulbos também pequenos e atípicos, morfologicamente semelhantes a uma cebola, com ausência de dentes, denominado de “coquinho”, como ilustrado na Figura 8B.

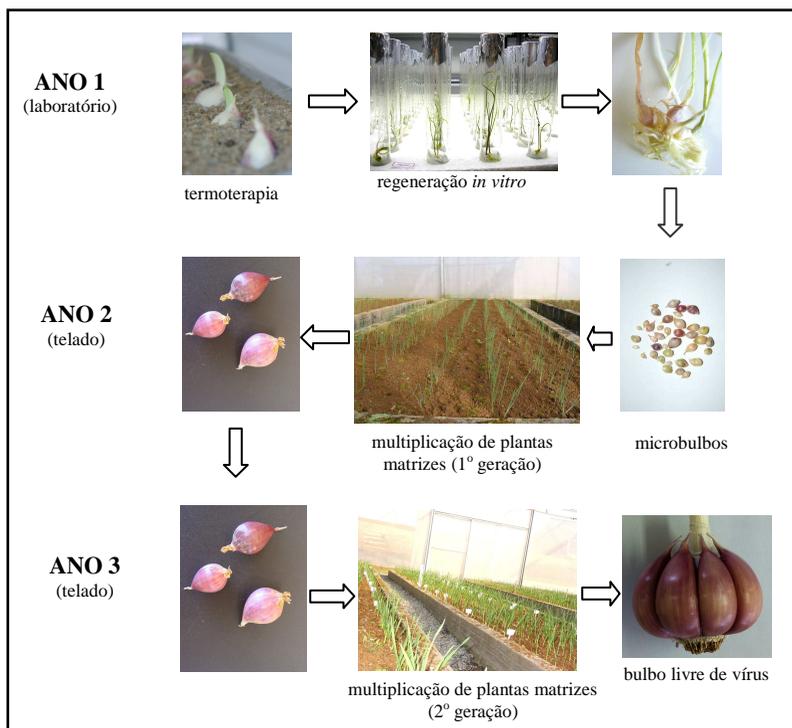


Figura 7 – Diagrama da limpeza de vírus de alho através da cultura de meristemas associada à termoterapia. Caçador, SC, 2012.

Em plantas de alho regeneradas *in vitro* a partir de meristemas caulinares, este fato se constitui, portanto, num fator limitante e um grande desafio na micropropagação do alho, visto que, a diferenciação de gemas nos bulbos regenerados *in vitro*, proporcionaria um aumento significativo no rendimento de bulbilhos-sementes. Assim, a possibilidade de aumentar a taxa de multiplicação de sementes *ex vitro*

fica reduzida, uma vez que um bulbo completo pode produzir, em média, 8 a 14 bulbilhos-semente, ou seja, uma taxa de multiplicação de sementes livre de vírus *ex vitro* que pode chegar a 1:14.

Na maioria dos laboratórios de cultura de tecidos de plantas, as culturas são mantidas sob temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 horas/luz, e intensidade luminosa de 60 a 70 μmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de lâmpadas fluorescentes brancas, durante todo o período de cultivo, de modo a favorecer um grande número de espécies em cultivo. Nestas circunstâncias, os sistemas atuais de produção de alho *in vitro* ainda não permitem a formação plena de um bulbo de alho, necessitando estudos mais aprofundados, com enfoque em fatores ambientais e em substâncias endógenas eventualmente envolvidas nesse processo.

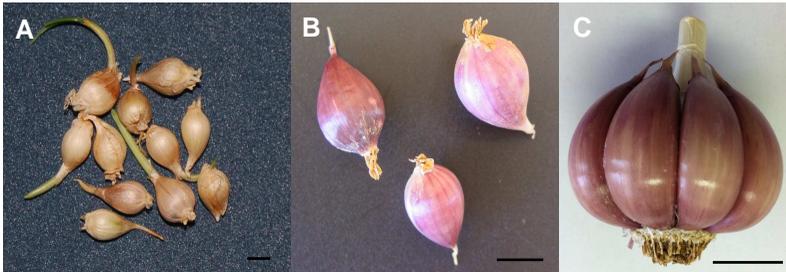


Figura 8 - Bulbos de alhos livres de vírus. **A**: microbulbos regenerados *in vitro*; **B**: primeira geração multiplicada em telado; e **C**: segunda geração multiplicada em telado (bulbo completo). Barras: 0,5cm (A); 1,0cm (B); 2,0 cm (C). Caçador, SC, 2011.

5.5. Criopreservação e crioterapia

A criopreservação é definida como a conservação de material biológico em nitrogênio líquido a -196°C , ou, em sua fase de vapor, a -150°C (Santos, 2000). Essa técnica pode assegurar a conservação de material biológico por longo período de tempo, uma vez que, nessas temperaturas ultra baixas, o metabolismo celular fica tão reduzido que a deterioração biológica é virtualmente paralisada (Santos, 2000). O grande desafio para o criobiologista é realizar um congelamento sem a formação de cristais de gelo no interior das células (Santos, 2000). A formação de gelo no meio intracelular causa ruptura do sistema de membranas celulares, resultando em perda da semi-permeabilidade e da

compartimentação celular, em consequência disso, as células entram em colapso e morrem.

De acordo com Vertucci & Farrant (1995), evitar a formação desses cristais não é uma tarefa fácil, pois os tecidos vegetais usados para a criopreservação, geralmente, apresentam altos teores de água em suas células e extensiva formação de cristais de gelo intracelular irá ocorrer caso estes tecidos sejam congelados no estado hidratado. Portanto, é necessário que a água seja removida antes do congelamento, para evitar a injúria causada pelos cristais de gelo.

A desidratação não é um processo simples, visto que a água tem muitas funções biológicas fundamentais nas células de organismos vivos (Kramer & Boyer, 1995). Assim, o sucesso de um protocolo de criopreservação depende da desidratação para um teor de umidade que seja baixo o suficiente para evitar a formação de gelo intracelular, mas não tão reduzido que cause injúria na célula por desidratação (Santos, 2000).

Os primeiros protocolos de criopreservação de tecidos vegetais eram baseados no congelamento lento (método clássico) até uma temperatura de pré-congelamento (-30 a - 40°C), a uma velocidade de congelamento definida (1 a 10°C/hora), usando-se um congelador programável, seguido de imersão direta em nitrogênio líquido (Santos 2000). Esse método foi baseado nos eventos físico-químicos que ocorrem durante o processo de congelamento em condições naturais, os quais foram descritos por Mazur (1969). Segundo esse autor, à medida que a temperatura decresce, aproximando-se de 0°C, a célula e seu meio externo atingem um estado de super-resfriamento e, posteriormente, ocorre a formação de gelo no meio extracelular.

Se o congelamento ocorre lentamente, a água se difunde do interior da célula super congelada para o meio externo devido à diferença de pressão do vapor da água (maior dentro da célula que nos espaços intercelulares congelados) e é convertida em gelo na superfície das células ou entre o protoplasto e a parede celular (Santos, 2000). Com isso, ressalta o mesmo autor, a célula desidrata-se, reduzindo a um mínimo ou removendo completamente a água livre presente e evitando assim, a formação de gelo em seu interior. Quando o potencial hídrico das células parcialmente desidratadas iguala-se àquele do gelo extracelular, é estabelecido um equilíbrio e a desidratação pára, contanto que a temperatura permaneça constante (Ellis et al., 2005).

O processo de vitrificação tornou-se um dos principais métodos de crioproteção de estruturas vegetais durante a criopreservação, tendo sido

aplicado a uma ampla variedade de tecidos vegetais (Marin et al., 1990; Fabre & Dereuddre, 1990; Keller, 2002; Engelmann, 2004 e Ellis et al., 2005 e 2006). Vitricificação ou formação do estado vítreo é o processo através do qual a água sofre uma transição da fase líquida para um estado sólido amorfo e meta-estável (Fahy et al., 1984). A transição para o estado vítreo não envolve mudanças químicas, mas apenas mudanças físicas na viscosidade do líquido (Franks, 1982).

Segundo Ellis et al. (2005), a vitricificação do citoplasma é obtida através da desidratação dos tecidos para um teor de umidade em que não existe água livre para a cristalização antes de mergulhar em nitrogênio líquido. Esse mesmo autor afirma que a solução celular se torna muito concentrada e pode passar pela transição de vitricificação quando uma velocidade de congelamento apropriada é utilizada, evitando deste modo a formação de gelo durante a exposição a temperaturas abaixo de zero.

A desidratação celular pode ser obtida por evaporação da água ou por tratamento com solução altamente concentrada de crioprotetores químicos (solução de vitricificação) tais como dimetilsulfóxido (DMSO), etileno glicol, glicerol e propileno glicol. Entretanto, estes crioprotetores podem causar citotoxicidade e estresse osmótico, levando à morte das células ou modificando sua resposta morfogênética em cultura (Sakai, 1995).

Os açúcares como a sacarose e glicose têm sido utilizados como substâncias crioprotetoras porque são excelentes agentes vitrificadores e, além disso, não apresentam toxicidade para as células vegetais mesmo quando se acumulam em grande quantidade no citoplasma (Wang et al., 2003) e ainda mostram alta eficiência na estabilização das membranas celulares durante o congelamento, em comparação com os crioprotetores tradicionais (Ellis et al., 2005).

Segundo Dumet et al. (1993) existem evidências de que o modo de ação dos açúcares envolve múltiplos componentes, agindo primeiramente como agentes osmóticos externos, removendo o excesso de água intracelular através de um gradiente osmótico. Por outro lado, Santos (2000) afirma que o modo de ação dos açúcares na aquisição da tolerância à desidratação e ao congelamento ainda não é totalmente conhecido e uma correlação direta de causa e efeito ainda não foi demonstrada.

Uma grande vantagem da vitricificação é que os tecidos vitrificados podem ser congelados rapidamente pelo mergulho direto em nitrogênio líquido, eliminando assim a necessidade de usar congeladores programáveis (Crowe et al., 1997). Durante o rápido decréscimo da

temperatura, em contraste com o congelamento lento, não há tempo suficiente para o crescimento de cristais de gelo no espaço intracelular e com isto as células passam rapidamente pela zona de temperatura na qual o crescimento letal de cristais de gelo ocorreria (Makowska et al., 1999).

Para Leopold (1990) o estado vítreo tem muitos outros efeitos benéficos para a célula desidratada, tais como: limitação da perda de água, limitação da cristalização de sais e proteínas no citoplasma, proteção contra mudanças no pH à medida que a água é removida, e prevenção de colapso celular durante extensiva perda de água. A vitrificação ainda restringe a difusão de substratos e produtos dentro da célula, levando a um estado de quiescência metabólica, e resultando na prevenção de reações químicas dependentes do processo de difusão (Koster, 1991).

Devido a estas características do estado vítreo, a deterioração de sistemas biológicos é suprimida, assegurando a estabilidade durante o período de quiescência (Santos, 2000).

Para muitas espécies, a criopreservação é aplicada para superar as limitações enfrentadas por estratégias tradicionais de conservação de germoplasma no campo, sementes e em coleções de cultura *in vitro* (Wang et al., 2008). Entretanto, esta técnica de conservação pode ser também utilizada para a erradicação de vários patógenos em plantas, incluindo os complexos virais (Brison et al., 1997).

Na literatura mundial já existem trabalhos relatando o uso de técnicas de criopreservação para eliminar viroses em diferentes espécies vegetais, tais como: *Musa spp.* (Helliot et al., 2002), *Ipomoea batatas* (Wang & Valkonen, 2008) e *Vitis vinifera* (Wang et al., 2003). Os relatos sobre o sucesso da criopreservação de germoplasmas de alho ainda são raros, (Niwata, 1995; Hannan & Garoutte, 1996; Makowska et al., 1999; Keller, 2002 e Ellis et al., 2005), porém, informações referentes à avaliação do potencial do uso desta técnica para remoção de complexos virais em alho não foram reportadas até o momento.

Na criopreservação, as células vegetais são preparadas para tolerar temperaturas ultra-baixas em nitrogênio líquido através da desidratação de tecidos com uso de soluções crioprotetoras. Estes tratamentos são aplicados para prevenir a formação de cristais de gelo em células, aliviando assim os danos para organelas e membranas para aumentar a taxa de sobrevivência de células (Benson, 2008).

No caso de ápices caulinares, as células da zona meristemática diferem de células mais afastadas do domo apical por serem menores e possuírem vacúolos pequenos e, geralmente, possuem uma relação

núcleo-citoplasma maior (Wang & Valkonen, 2008). As células meristemáticas, portanto, suportam mais a desidratação do que as células diferenciadas afastadas do domo apical, cuja fisiologia também é perturbada pela infecção de agentes patogênicos. A crioterapia, portanto, se vale dessas diferenças físico-anatômicas e é levada a destruir células infectadas de tecidos diferenciados por um breve tratamento em nitrogênio líquido.

A localização do patógeno nos tecidos submetido a crioterapia, a indispensabilidade do tratamento em nitrogênio líquido para a obtenção de regenerantes sadios e estudos ultraestruturais das células lesadas pelos efeitos do congelamento são fundamentais para compreender os efeitos da criogenia como método de erradicação de patógenos em plantas.

6. Referências Bibliográficas

ABBEY, L.; FORDHAM, R. Abiotic stress affects shallot growth performance. **Crop Research**, v.16, p.66-69. 1998.

ADAMS, M. J.; ANTONIW, J. F.; BAR-JOSEPH, M.; BRUNT, A. A.; CANDRESSE, T.; FOSTER, G. D.; MARTELLI, G. P.; MILNE, R. G.; FAUQUET, C. M. The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. **Archives of Virology**, v.149, p.1045-1060. 2004.

ALLEMANN, J.; HAMMES, P.S. Effect of photoperiod on tuberization in the Livingstone potato (*Plectranthus esculentus* N.E.Br. *Lamiaceae*). **Field Crop Research**, v.98, n.1, p.76–81. 2006.

AMEN, R.D. A model of seed dormancy. **Botanic Review**, v.34, n.1, p. 1-31. 1968.

AOBA, T.; TAKAGI, H. Studies on bulb formation in garlic plants. III. The effects of cooling treatment of the seed bulb and of daylength during the growing period on bulb formation. **Journal of the Japanese Society of Horticultural Science**, Tokio, v.49, n.3 p.240-241, 1971.

ARGUELLO, J. A.; BOTINI, R.; LUNA, R.; DE BOTINI, G.A.; RACCA, R.W. Dormancy in Garlic (*Allium sativum* L.) cv. Rosado Paraguayo I. Levels of Growth Substances in Seed Cloves under Storage. **Plant Cell Physiology**, v.24, n.8, p. 1559-1963 (1983).

ARGUELLO, J. A.; DE BOTTINI, G. A.; LUNA, R.; BOTTINI, R. Dormancy in Garlic (*Allium sativum* L.) cv. Rosado Paraguayo II. The Onset of the process during Plant Ontogeny. **Plant Cell Physiology**, v.27, n.3, p.553-557. 1986.

ASCOUGH, G.D.; ERWIN, J.E.; VAN STADEN, J. *In vitro* storage organ formation on ornamental geophytes. **American Society for Horticultural Science**, v. 34, p. 417–444. 2008.

BARANDIARAN, X.; MARTIN, N.; RODRIGUEZ-CONDE, M.F.; DI PIETRO, A. Genetic variability in callus formation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.). **Plant Cell Reports**, v.18, p. 434–437. 1999.

BARROCAS, E. N.; MACHADO, J. C.; FIGUEIRA, A. dos REIS. Uso de técnicas moleculares para diagnose de patógenos em sementes. **Informe Agropecuário**, v.30, n.253, p.24-32. 2009.

BENSON, E. E. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory and practice. **Critical Reviews Plant Sciences**, v.27, p.141–219. 2008.

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

BRAGA, F. T. **Ambiente de cultivo na propagação *in vitro* de crisântemo (*Dendranthema grandiflora* tzvelev cv. Rage): características anatômicas e fisiológicas.** Lavras, 2006. 132 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Lavras.

BRAZ, L.T.; SILVA, E.J.; CASTELLANE, P.D. The effects of pre-planting refrigeration on bulbs over the development and yield of garlic "Chines", "Contestado" and "Quitéria". **Acta Horticulturae**, n.433, p.499-505. 1997.

BREWSTER, J.L. **Onions and Other Vegetable *Alliums*.** CAB International, Wallingford, UK, 1994. 236 p.

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

BRISON, M; BOUCAUD, M-T; PIERRONNET, A; DOSBA, F. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv. Prunus rootstock experimentally contaminated with Plum Pox Potyvirus. **Plant Science**, v.123, p.189–196, 1997.

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.

BURBA, J.L. 1993. **Obtencion de nuevas variedades de ajo**. In: 50 temas sobre La producción de ajo. Ed. Por J.L. Burba. La Consulta, Mendoza: INTA EE La Consulta, 2 volume 1997. p. 49-53.

BURBA, J.L.; GALMARINI, C.R. (eds) (1997). Proceedings of the First International Symposium on Edible *Alliaceae*, 14–18 March 1994, Mendoza, Argentina. **Acta Horticulturae** 433, 652 p.

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.

CHARLES, G.; ROSSIGNOL, L.; ROSSIGNOL, M. A synchronous model perfecting for fundamental studies on the tuberization process. **Journal Plant Physiology**, v.142, p.474- 479. 1993.

CHUN, K.B.; SOH, W.Y. Histological observation on the formation of cloves in the development process of garlics plants. **Journal Korean Society Horticultural Science**, v.21, n.2, p.119-125. 1980.

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.

CONCI, V.C. Vírus y Fitoplasmas de ajo. In: Burba (Ed.) **50 temas sobre produccion de ajo – Ingenieria de cultivo**. v.l.3, p.267-291, 1997.

CONCI, V. C.; LUNELLO, P.; BURASCHI, D. Variations of *Leek yellow stripe virus* concentration in garlic and its incidence in Argentina. **Plant disease**, v.86, p. 1085-1088. 2002.

CROWE, J.H.; OLIVER, A.E.; HOEKSTRA, F.A.; CROWE, L.M. Stabilization of dry membranes by mixtures of hydroxyethyl starch and glucose: the role of vitrification. **Cryobiology**, v.35, p. 20-30. 1997.

CUNHA, C.P. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites e caracterização da diversidade genética molecular de acessos de alho (*Allium sativum* L.)**. Piracicaba, 2011. 90f. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo/ESALQ.

DANIELS, J. Ocorrência de vírus em alho no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**: Brasília, DF, v.24, n.1, p.91. 1999.

De CANDOLLE, A. (1886). **Origin of Cultivated Plants**. Reprint from the English edn (1967). Hafner, New York, 468 p.

DE MASON, D.A. Morphology and anatomy of *Allium*. In: Rabinowitch, H.D. and Brewster, J.L. (eds). **Onions and Allied Crops**, Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, Florida, p.27–51. 1990.

DEON, C.M.; LAPIDOT, M.; BEACHY, R.N. Plant vírus movement proteins. **Cell**, v.69, p.221-224. 1992.

DERMASTIA, M.; RAVNIKAR, M.; VILHAR, B. Increased level of cytokinin ribosides in jasmonic acid-treated potato (*Solattum tuberosum*) stein node cultures. **Physiology Plant**. v.92, p.241-246. 1994.

DON, G. (1827). A monograph of the genus *Allium*. An advance reprint of **Memoirs of the Wernerian Natural History Society** v.1, p. 1-102, 1832.

DOVAS, I. C.; HATZILOUKAS, E.; SALOMON, R.; BARG, E.; SHIBOLETH, Y.; NIKOLAOS, I. K. Incidence of viruses infecting *Allium* spp. in Greece. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p. 677-684. 2001.

DUMET, D.; ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y.; DEREUDDRE, J. Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-Letters**, v.14, p.243-250. 1993.

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

EL MOTAZ BILLAN, M.; OMAR, F.A.; MAN ARAFA, A.; GHETA, M.; HASSAN SHAHIN, A.; ZEIN, A. The effect of the same treatment on yield and quality of Egyptian garlic. **Agricultural Research Review**, v.49, n.5, p. 157-172. 1971.

ELLIS, D. SKOGERBOEL, D.; ANDRE, C.; HELLIER, B.; GAYLE, V. Cryopreservation of 12 *Allium sativum* (garlic) accessions: a comparison of plant vitrification solutions (pvs2) and pvs3. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v.7, p. 11-12. 2005.

ELLIS, D. SKOGERBOEL, D.; ANDRE, C.; HELLIER, B.; GAYLE, V. Implementation of garlic cryopreservation techniques in the national plant germplasm system. **Cryo-Letters**, v.27, n.2, p. 99-106. 2006.

ENGELMANN, F. Plant Cryopreservation: Progress and prospects. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v.40, p. 427-433. 2004.

ERNST, E. Editorial. **Molecular Nutrition and Food Research**, Weinheim, v.51, p.1317. 2007.

ESPÍNOLA SOBRINHO, J. **Influência do tipo de arquitetura do dossel na absorção de radiação solar, na produtividade e na qualidade do fruto da mangueira**. 258p. Campina Grande, 2003. (Tese de Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco.

ETOH, T. An attempt to obtain binucleate pollen of garlic, *Allium sativum* L. **Memoirs of the Faculty of Agriculture of Kagoshima University**, v.16, p. 65-73. 1980.

ETOH, T. Studies on the sterility in garlic, *Allium sativum* L. **Memoirs of the Faculty of Agriculture**, Kagoshima University, v.21, p. 77-132. 1985.

ETOH, T. Fertility of the garlic clones collected in Soviet Central Asia. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v.55, p.312-319. 1986.

ETOH, T.; OGURA, H. A morphological observation on the formation of abnormal flowers in garlic (*Allium sativum* L.). **Mem Fac Agri**, Kagoshima Univ, v.13, p. 77-88. 1977.

ETOH. T.; SIMON, P.W. Diversity, fertility and seed production of garlic. In: Rabinowitch HD, Currah L (eds.) **Allium Crop Science: Recent Advances**. CABI, New York, p. 101–107. 2002.

FABRE, J.; DEREUDDRE, J. Encapsulationdehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. **Cryo-Letters**, v.11, p.413-426. 1990.

FAHY, G.M.; MACFARLANE, D.R.; ANGELL, C.A.; MERYMAN, H.T. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v.21, p.407-426. 1984.

FAJARDO, T. V. M.; NISHIJIMA, M.; BUSO, J. A.; TORRES, A. C.; ÁVILA, A. C.; RESENDE, R. O. Garlic Viral Complex: Identification of *Potyvirus*es and *Carlavirus* in Central Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.619-626. 2001.

FAJARDO, T.V.M.; TORRES, A.C.; BUSO, J.A.; ÁVILA, A.C.; RESENDE, R.O. Produção e qualidade de bulbos de alho livre de suas principais viroses. **Summa Phytopathologica**, v.28, p.207-210, 2002.

FAYAD-ANDRÉ, M. S. **Diagnose, disseminação e efeitos fisiológicos do complexo viral do alho em regiões produtoras do Brasil**. Brasília: Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, 2010, 137 p. Tese de Doutorado.

FEREOL, L.; CHOVELON, V.; CAUSSE, S.; MICHAUX-FERRIERE, N.; KAHANE, R. Evidence of a somatic embryogenesis process for plant regeneration in garlic (*Allium sativum* L.). **Plant Cell Reports**, v.21, n.3, p.197-203. 2002.

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.

FIGLIUOLO, G.; Di STEFANO, D.; Is single bulb producing garlic *Allium sativum* or *Allium ampeloprasum*? **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.114, p.243-249. 2007.

FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. de C. L.; CHU, E. P.; ALMEIDA, V. P. Tuberização In: Gilberto Barbante Kerbauy. (Org.). **Fisiologia Vegetal**. 1ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004, p. 409-420.

FILGUEIRA, F. A. R., Manual de Olericultura – **culturas e comercialização de hortaliças**. 2^a ed. São Paulo, Agronômica Ceres, 1992. p. 105 – 142. 2v.

FRANKS, F. The properties of aqueous solutions at subzero temperatures. In: FRANKS, F. (Ed.) **Water: a comprehensive treatise**. New York, Plenum Press, 1982. p. 215-218.

GAMA, M.I.C.S.; ÁVILA, A.C. Detecção de vírus em alho por látex sensibilizado e microscopia eletrônica imuno específica. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.13, n.1, p.66-69. 1998.

GARCIA, A. Cultivares e épocas de plantio de alho em dois municípios do Rio Grande do Sul. **Horticultura Brasileira**: Brasília, DF, v. 4, n. 1, p. 44 – 76. 1984.

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

GOPAL, J.; MINOCHA, J.L.; DHALIWAL, H.S. Microtuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). **Plant Cell Reports**, v.17, p.794–798. 1998.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**, Brasília, ABCTP/EMBRAPA, CNPH, 1990, 433p.

GUERRA, M. P. Giberelinas. In: Gilberto Barbante Kerbauy. (Org.). **Fisiologia Vegetal**. 1ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004, p. 279-292.

HANNAN, R.; GAROUTTE, D. **Proceedings of the 1995 National Onion Research Conference**, Madison: Wisconsin, p. 101-103. 1996.

HARVEY, M.J. Onion and other cultivated *Alliums*. In: SMARTT & SIMONDS. 1987. **Evaluation of Crop Plant**, London-England. 2nd ed., p.445-448.

HELLIOT, B; PANIS, B.; POUMAY, Y; SWENEN, R.; LEPOIVRE, P.; FRISON, F. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa spp.*). **Plant Cell Reports**, v.20, p.1117–1122. 2002.

<http://www.rothamsted.bbsrc.ac.uk/ppi/link/pplinks/viruseqs/viruses.php>
. Acessado em: 25/03/2010.

ICTVdb. **The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/>. Acessado em: 15/03/2010.

IPEK, M.; IPEK, A.; ALMQUIST, S.G.; SIMON, P.W. Demonstration of linkage and development of the first low-density genetic map of garlic, based on AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.110, p.22–236. 2005.

IPEK, M.; SIMON, P.W. Comparison of AFLPs, RAPD markers, and isozymes for diversity assessment of garlic and detection of putative duplicates in germplasm collections. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.128, p.24–252. 2003.

JACOBS, S.S.; HELLMER, H.H.; DOAKE, C.S.M.; JENKINS, A.; FROLICH, R.M. Melting of ice shelves and the mass balance of Antarctica. **Journal of Glaciology**, **38**, 375–387. 1992.

JENDEREK, M.M. Generative reproduction of garlic (*Allium sativum*). **Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej im. H. Kolltaja w Krakowie** v.57, p.14–145. 1998.

JENDEREK, M.M.; HANNAN, R.M. Variation in reproductive characteristics and seed production in the USDA garlic germplasm collections. **HortScience**, v.39, p.478–488. 2004.

JONES, H.A.; MANN, L.K. *Onions and Their Allies*. **Leonard Hill Books**, London, 286 p. 1963.

JONES, R.N. Cytogenetics. In: RABINOWITCH, H.D.; BREWSTER, J.L. (eds) *Onions and Allied Crops*, Vol. I. **Botany, Physiology and Genetics**. CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 199–214. 1990.

KATARZHIN, M.S.; KATARZHIN, I.M. Experiments on the sexual reproduction of garlic. **Byulleten'Vsesoyuznogo Ordena Lenina I Ordena Druzhby Narodov Instituta Rasteniievodstva Imeni N.I. Vavilova**, v.80, p.74–76. 1978.

KAZAKOVA, A. A. Most common onion species, their origin and intraspecific classification. **Trudy po Prikladnoi Botanike, Genetike I Seleksii**, v.45, n.1, p.19–41. 1971.

KELLER, J. **Cryopreservation of Plant Germplasm II**. (eds.) Towill and Bajaj, Springer-Verlag, Berlin, p. 37-47. 2002.

KENEL, F.; EADY, C.; BRINCH, S. Efficient *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and regeneration of garlic (*A. sativum* L.) immature leaf tissue. **Plant Cell reports**, Berlin, v.29, p.223-230. 2010.

KIM, K.; DAVELAAR, E.; DE KLERK, G. Abscisic acid controls dormancy development and bulb formation in lily plantlets regenerated *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.90, p.59-64. 1994.

KIM, Y.J.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. *In vitro* propagation of *Hyacinthus*. **Horticultural Science**, v.16, p. 645-647. 1981.

KITAJIMA, E.W. A rapid method to detect particles of some spherical plant viruses in fresh preparations. **Journal Electron Microscopy**, v.20, p.503-512. 1969.

KOLLMANN, F. *Allium ampeloprasum* L., a polyploid complex. I. Ploidy levels. **Israel Journal of Botany**, v.20, p.13–20. 1971.

KOLLMANN, F. *Allium ampeloprasum* L. - a polyploid complex. II. Meiosis and relationships between the ploidy types. **Caryologia**, v.25, p. 295–312. 1972.

KONDO, T.; HASEGAWA, H.; SUZUKI, M. Transformation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by *Agrobacterium*-mediated gene transfer. **Plant Cell Reports**, v.19, p.989–993. 2000.

KONONKOV, P.F. The question of obtaining garlic seed. **Sad i Ogorod**, v.8, p.38–40. 1953.

KOO, B. J.; KANG, SANG-CU.; CHANG, M. U. Survey of garlic virus disease and phylogenetic characterization of garlic viruses of genus *Allxivirus* isolated Korea. **Journal Plant Pathology**, v.18, p. 237-243. 2002.

KOSTER, K.L. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, v.96 p. 302-304. 1991.

KOTLINSKA, T.; HAVRANEK, P.; NAVRATILL, M.; GERASIMOVA, L.; PIMAKHOV, A.; NEIKOV, S. Collecting onion, garlic and wild species of *Allium* in central Asia, USSR. FAO/IBPGR. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v.83, n.84, p.31–32. 1991.

KRAMER, P.J.; BOYER, J.S. **Water relations of plants and soils**. San Diego, CA, Academic Press. 1995.

LEOPOLD, A.C. Coping with desiccation. In: ALSCHER, J.G.; CUMMING, J.R. (Eds) **Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms**. New York, Wiley-Liss, p. 37-56. 1990.

LINNAEUS, C. **Species Plantarum**, Vol. 1. (Reprinted 1957.) Ray Society, London, 560 p. 1753.

LUCKWILL, L.C. Growth-inhibiting and growth-promoting substances in relation to dormancy and after-ripening of apple seeds. **Journal Horticultural Science**, v.27, p.53-67. 1952.

- MAAß, H.I.; KLAAS, M. Intraspecific differentiation of garlic (*Allium sativum* L.) by isozyme and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v.91, p. 89–97. 1995.
- MAKOWSKA, Z.; KEKKER, J.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of apices isolated from garlic (*Allium sativum* L.) bulbils and cloves. **Cryo-Letters**, v. 20, p.175-183. 1999.
- MANN, L. K. Anatomy of the garlic bulb and factors affecting bulb development. **Hilgardia**, Berkeley, v.21, n.8, p.195-249. 1952.
- MARIN, M.L.; MAFLA, G.; ROCA, W.M.; WITHERS, L.A. Cryopreservation of cassava zygotic embryos and whole seeds in liquid nitrogen. **Cryo-Letters**, v.11, p. 257-264. 1990.
- MATSUMOTO, S.N. **Períodos de vernalização de bulbilhos e épocas de plantio de alho (*Allium sativum* L.) Cultivar Roxo Pérola de Caçador**. Botucatu, 1988. 66p. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Paulista.
- MAZUR, P. Freezing injury in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v.20, p.419. 1969.
- McCOLLUM, G.D. Onion and allies. In: N.W. SIMMONDS (Ed.). **Evolution of crop plants**. New York: Longman, p. 186-190. 1976.
- MEDINA, R. D.; FLACHSLAND, E. A.; GONZALEZ, A. M.; TERADA, G. *In vitro* tuberization and plant regeneration from multimodal segment culture of *Habenaria bractescens* Lindl., an Argentinean wetland orchid. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.97, p.91–101. 2009.
- MELO-FILHO, P. A.; RESENDE, R. O.; CORDEIRO, C. M. T.; BUSO, J.A.; TORRES, A.C.; DUSI, A. N . Viral reinfection affecting bulb production in garlic after seven years of cultivation under field conditions. **European Journal of Plant Pathology**, v.116, p. 95-101. 2006.
- MENEZES SOBRINHO, J.A. **Cultivo do alho (*Allium sativum* L.)**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA/CNPQ, 1997. 16 p. (Instruções Técnicas, 2).

MENEZES SOBRINHO, J.A.; Coord. **Instruções técnicas do CNPHortaliças 2**. Brasília: EMBRAPA, 16p. 1984.

MUELLER, S.; VIEIRA, R. L.; BIASI, J. Efeito da limpeza de vírus sobre a produtividade de alho em Caçador, SC. **Agropecuária Catarinense**, v.18, p.50-52. 2005.

MYERS, J.M.; SIMON, P.W. Microprojectile bombardment of garlic, *Allium sativum* L. **Proceedings of the 1998 National Onion (and other Allium) Research Conference**. University of California, Davis, California, p. 121-126. 1998.

NIIMI, Y.; ONOZAWA, T. *In vitro* bulblet formation from leaf segments of lilies, especially *Lillium rubellum* Baker. **Science Horticulturae**, v.11, p. 379-389. 1979.

NIWATA, E. Cryopreservation of *Allium*. **Cryo-Letters**, v.16, p.102-107. 1995.

OLIVEIRA, V. R.; MENDONÇA, J. L.; SANTOD, C. A. F. **Sistema de Produção de Cebola (*Allium cepa* L)**. Sistemas de Produção, 5 - Versão Eletrônica Dezembro/2004. Embrapa hortaliças.

PARMESSUR, Y.; ALJANABI, S.; SAUNTALLY, S.; DOOKUNSAUNTALLY, A. Sugarcane yellow leaf virus and yellows phytoplasma: elimination by tissue culture. **Plant Pathology**, Oxford, v.51, p.561-566. 2002.

PAVAN, M. A.; GUIMARÃES, A. M. ; KAMITSUJI, M. K. ; MATSUMOTO, S. N. Amostragem da incidência de viroses em cultivares de alho nobre (*Allium sativum* L.) proveniente de regiões produtoras do Estado de Santa Catarina. In: XXII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 1989, São Paulo, SP. **Fitopatologia Brasileira**, v. 14. p. 136-136. 1989.

PLANT VIRUS SEQUENCE. Disponível em: (<http://www.rothamsted.bbsrc.ac.uk/ppi/link/pplinks/viruseqs/viruses.php>). Acessado em: 15/08/2010.

POOLER, M.R. **Sexual reproduction in garlic**, (*Allium sativum* L.). PhD thesis, University of Wisconsin-Madison, USA. 1991.

POOLER, M.R.; SIMON, P.W. Garlic flowering in response to clone, photoperiod, growth temperature, and cold storage. **HortScience**, v. 28, n. 1, p. 1085-1086. 1993.

RACCA, R.; LEDESMA, A.; REALE, M. I.; COLLINNO, D. Efecto de bajas temperaturas en almacenaje de pre-plantación y condiciones termoperiódicas de cultivo en la bulbificación de ajo (*Allium sativum* L.) cv. Rosado Paraguayo, **Phyton**: Buenos Aires, v.41, n.2 p.77-82. 1981.

RAKHIMBAEV, I. R.; SOLOMINA, V. F. The activity of endogenous cytokins during garlic storage at low temperature. **Vostoik Sel. Khoz. Nalki Nazakhstana**, v.2, p. 46-48. 1980.

RAVNIKAR, M; ZEL, J; PLAPER, I; SPACAPAN, A. Jasmonic acid stimulates shoots and bulb formation of garlic *in vitro*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.12, p. 73-77, 1993. 1993.

REGEL, E. *Allii species Asiae centralis*. **Acta Horticultural Petropolitani**, v.10, p.279-362. 1887.

RESENDE, F.V.; SOUZA, R.J.; PASQUAL, M. Comportamento em condições de campo de clones de alho obtido por cultura de meristema. **Horticultura Brasileira**: Brasília, v.13, n.1, p.44-46. 1995.

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

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

SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture and forestry, vol 32. Cryopreservation of plant germplasm I**. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, p.53-69. 1995.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação: Potencial e perspectivas para conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.70-84. 2000.

SATO, A. Y.; SEDIYAMA, T.; BORÉM, A.; CECON, P. R.; JUNQUEIRA, C. S. Influência do ácido abscísico na micropropagação da cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Acta Scientiarum Maringá**, v. 23, n. 5, p. 1235-1237. 2001.

SAWAHEL, W.A. Stable genetic transformation of garlic plants using particle bombardment. **Cellular and Molecular Biology Letters**, Wroclaw, v.7, p.49-59. 2002.

SHAH, J. J.; KOTHARI, I. L. Histogenesis of garlic clove. **Phytomorphology**, v.23, p.162-170. 1973.

SEABROOK, J.E.A; COLEMAN, S.; LEVY, D. Effect of photoperiod on in vitro tuberization of potato (*Solanum tuberosum* L.). **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.34, p.43-51. 1993.

SHIBOLETH, Y. M.; GAL-ON, A.; KOCH, M.; RABINOWITCH, H. D.; SALOMON, R. Molecular characterisation of *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) infecting garlic (*Allium sativum* L.) in Israel: Thermotherapy inhibits vírus elimination by meristem tip culture. **Annual Applied of Biology**, v.138, p.187-195. 2001.

SIDIKOU, R.; SIHACHAKR, D.; LAVERGNE, D.; NATO, A.; ELLISSECHE, D.; JOUAN, B.; DUCREUX, G. Etude de la microtuberisation de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) au sahel. **Cahiers Agricultures**, v.12, p. 7-14. 2003.

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

SILVA, J. L. O. da. **Análise do crescimento de alho (*Allium sativum* L.) cultivar Chonan, sob três períodos de frigidificação pré-plantio dos bulbos**. Lavras, 1982. 76 p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Lavras.

SILVA, K. Explante, citocinina e luz: fatores que afetam a organogênese de porta enxerto de macieira cultivar m-9. **Revista Brasileira Agrocência**, Pelotas, v. 11, n. 3, p. 365 -367. 2005.

SIMON, P.W.; JENDEREK, M.M. Flowering, seed production and the genesis of garlic breeding. In: JANICK, J. (ed.) **Plant Breeding Reviews**, vol. 2. Wiley, New York, p.211-244. 2003.

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

SLABBERT, M.M; NIEDERWIESER, J.G. *In vitro* bulblet production in *Lachenalia*. **Plant Cell Reports**, v.18, p. 620-624. 1999.

SRIVASTAVA, R. P.; ADHIKARI, B. S. Influence of growth substances on the germination of onion and garlic. **Allahabad Fmr**, v.42, p. 103-104. 1969.

STEINTZ, B., YAHIEL, H. *In vitro* propagation of *Narcissus tazetta*. **HortScience**, v.17, p.333-334. 1982.

SUGIMOTO, H.; TSUNEYOSHI, T., TSUKAMOTO, M.; URAGAMI, Y.; ETOH, T. Embryocultured hybrids between garlic and leek. **Allium Improv Newsl**, v.1, p.67-68. 1991.

TAKAKI, F.; SANO, T.; YAMASHITA, K.; FUJITA, F.; UEDA, K.; KATO, T. Complete nucleotide sequences of attenuated and severe isolates of *Leek yellow stripe virus* from garlic in northern Japan: Identification of three distinct virus types in garlic and leek world-wide. **Archives of Virology**, v.150, p.1135-1149. 2005.

TAKASHI, K.; FUJINO, K.; KIKUTA, Y. Expansion of potato cells in response to jasmonic acid. **Plant Science**. v.100, p.3-8. 1994.

THOMAS, T.H. Hormonal control of dormancy in relation to post harvest horticulture. **Annals of Applied Biology**, v.98, p.531-538. 1981.

TORRES, A.C.; TEIXEIRA, S. L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A. C.;

CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA – CNPH, CBAB, 1998. v.1 p.133-145.

TSAFACK, T. J. J.; GILBERT, P.; OMOKOLO, N. D.; BRANCHARD, M. Effect of photoperiod and thermoperiod on microtuberization and carbohydrate levels in Cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott). **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.96, p.151–159. 2009.

VAVILOV, N.I. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. **Chronica Botânica**, v.13, p.1–364. 1951.

VERTUCCI, C.W.; FARRANT, J.M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Eds.) **Seed development and germination**. New York, Marcel Dekker, p. 237-271. 1995.

VIEIRA, R.L.; NODARI, R.O. Diversidade genética de cultivares de alho avaliada por marcadores RAPD. **Ciência Rural**, v.37, p. 51-57. 2007.

WANG, Q.; MUNIR, M; Li, P.; GAFNY, R.; SELA, I; TANNE, E. Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. **Plant Science**, v.165, p.321–327. 2003.

WANG, Q.; VALKONEN, J. P. T. Efficient elimination of sweetpotato little leaf phytoplasma from sweetpotato by cryotherapy of shoot tips. **Plant Pathology**, v.57, p.338–347. 2008.

XU, R. Y; NIIMI, Y.; HAN, D. S. Changes in endogenous abscisic acid and soluble sugars levels during dormancy-release in bulbs of *Lilium rubellum*. **Scientia Horticulturae**, v.111, p.68–72. 2006.

YAMAZAKI, H.; NISHIJIMA, T.; YAMATO, Y.; MIURA, H. Involvement of abscisic acid (ABA) in bulb dormancy of *Allium wakegi* Araki I. Endogenous levels of ABA in relation to bulb dormancy and effects of exogenous ABA and fluridone. **Plant Growth Regulation**, v.29, p.189–194. 1999.

YURI, J. E. MOTA, J. H.; SOUZA, R. J.; RESENDE, M.; PASQUAL, M. Vernalização do alho para cultivo *in vitro*. **Horticultura Brasileira**: Brasília, v.17, n.2, p.118-124. 2005.

ZERBINI, F.M.; AMBROVEZÍCIOS, L.P.; NAGATA, A.K.I., **Diagnose molecular de fitoviroses**. In: ALMEIDA, A.M.R; LIMA, J.A.A. Princípios e técnicas de diagnose aplicados em fitovirologia. Londrina: Embrapa soja/Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, p. 95-124. 2001.

ZHAO, W.G.; CHUNG, J.W.; LEE, G.A; MA, K.H.; KIM, H.H.; KIM, K.T.; CHUNG, I.M.; LEE, J.K.; KIM, N.S.; KIM, S.M.; PARK, Y.J. Molecular genetic diversity and population structure of a selected core set in garlic and its relatives using novel SSR markers. **Plant Breeding**, Berlin, v.130, p.46-54. 2011.

ZHENG, S.J.; HENKEN, B.; AHN, Y.K.; KRENS, F.A.; KIK, C. The development of a reproducible *Agrobacterium tumefaciens* transformation system to garlic (*Allium sativum* L.) and the production of transgenic garlic resistant to beet armyworm (*Spodoptera exigua* Hubner). **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.14, p.293-307. 2004.

ZING, F. W. Rate of growth and nutrient absorption of late garlic. **Proceedings of the American Society Horticultural Science**, Califórnia, v.83, p.579-584. 1963.

CAPÍTULO II

MORFOGÊNESE DE PLANTAS DE ALHO (*Allium sativum* L.) *IN VITRO*: INFLUÊNCIA DO EXPLANTE, REGULADORES DE CRESCIMENTO, CARBOIDRATOS E CONDIÇÕES DO AMBIENTE.

1. Introdução

Existem duas rotas principais de regeneração *in vitro* de plantas inteiras a partir de células de plantas ou de tecidos excisados: via organogênese e via embriogênese somática (Gantait, 2010). Na micropropagação do alho, a regeneração via embriogênese somática tem levado à instabilidade genética (Novak, 1990; Al-Zahim et al., 1999; Zdravkovic-Korac et al., 2010), observada pelas alterações na expressão do fenótipo, causadas por efeito de genes epigeneticamente ativados (Bockish et al., 1997). Segundo Kerbauy (2011), o único meio para se assegurar a estabilidade genética, condição essencial à micropropagação, é a regeneração de plantas a partir de culturas de meristemas, desde que estas não originem calos. Porém, o mesmo autor afirma que esta pode não ser condição suficiente para garantir a estabilidade de um genótipo selecionado.

Um grande número de ensaios foi realizado *in vitro* ao longo da história da micropropagação do gênero *Allium* focando objetivos diversos, tais como: conservação de germoplasma (Niwata, 1995; Makowska et al., 1999; Keller, 2002; Ellis et al., 2005), estudos sobre embriogênese somática (Myers e Simon, 1998; Barandian et al., 1999; Fereol et al., 2002) e transformação genética (Myers & Simon, 1999 e Kenel et al., 2010). Entretanto, a limpeza clonal através da cultura de meristema é, sem dúvida, a técnica de cultura de tecidos vegetais mais regularmente aplicada a essas espécies.

Entre uma série de fatores que influenciam a indução e crescimento de órgãos de armazenamento *in vitro* pode-se destacar: a composição genética da planta, suplementos adicionados ao meio de cultura e condições ambientais. A constituição genética da planta depende da família, e esta, principalmente determina o tipo de explante que é mais comumente usado (Ascough et al., de 2008).

Os componentes do meio de cultura, tais como: formulação salina, reguladores de crescimento vegetal (tipo, concentração e proporção),

hidratos de carbono (tipo e concentração), meio de gelificação, e adição de outros novos agentes, podem ser ajustados para a indução de órgãos de armazenamento em uma espécie em particular (Medina et al., 2009). A formulação salina MS (Murashige & Skoog, 1962), que é universalmente empregada no cultivo *in vitro* de grande quantidade de espécies (Caldas et al., 1998), é o meio básico normalmente utilizado para as espécies do gênero *Allium*.

O uso dos fitorreguladores ANA (ácido naftalenoacético) e BAP (6-Benzilaminopurina) tem demonstrado eficiência na micropropagação de alho. Havranék (1972) cultivou ápices caulinares com 0,4 a 0,6 mm de tamanho e obteve desenvolvimento inicial de plantas, bulbificação e enraizamento, em meio MS com adição de vitaminas, sacarose (20 g L^{-1}), e ANA na concentração de (1 mg L^{-1}). Os efeitos de ANA e BAP foram avaliados por Matsubara & Chen (1989) em meio de cultura para desenvolvimento de explantes, enraizamento e bulbificação em plantas de alho, ambos na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. Esses autores observaram que nessas condições as plantas desenvolviam-se com maior vigor e com maior capacidade de aclimatização em condições de campo. Em concentração mais elevada de BAP ($0,3 \text{ mg.L}^{-1}$) no meio de cultura, Conci (1997) obteve plantas de alho livres de vírus com formação média de quatro bulbilhos a partir de um único meristema isolado.

Nos trabalhos de limpeza de vírus de alho por cultura de meristema realizados nos Laboratórios de Cultura de Tecidos de Plantas da Epagri (dados não publicados), tem sido comprovada a efetividade da citocinina BAP na fase inicial de cultivo de meristema da maioria das cultivares de alho nobre. Outra constatação é que o uso da auxina ANA tem sido eficaz na indução de enraizamento e bulbificação. A eficácia desses reguladores de crescimento foi comprovada nos níveis de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP e $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de ANA, para desenvolvimento inicial dos explantes e para enraizamento e bulbificação, respectivamente. Entretanto, a taxa média de multiplicação observada de 1,5 bulbilhos por explantes, é considerada baixa.

Outros reguladores do crescimento foram utilizados com êxito em meios de cultura para regeneração de plantas de alho. Rossi et al. (1995) obtiveram, para a cultivar “Piacentiano Bianco”, uma proliferação no número de bulbos de 1:4,5 utilizando o meio MS modificado, acrescido de Tidiazuron (TDZ).

Diversos trabalhos atribuem aos jasmonatos efeitos indutivos à formação de bulbos em algumas espécies de plantas cultivadas *in vitro*. Nojiri et al. (1992) demonstraram que as concentrações endógenas de

Ácido Jasmônico (AJ) foram diferentes na bulbificação e não bulbificação de partes de plantas de *A. cepa*. Em combinação com 2iP (Isopenteniladenina), a aplicação exógena de AJ estimulou a indução de brotações em fragmentos basais de bulbilhos de alho, que ainda resultou em uma alta porcentagem de formação de bulbos (Ravnikar et al., 1993; Zel et al., 1997). Os jasmonatos podem ainda estar envolvidos no processo de formação de órgãos de armazenamento em geral, estimulando a tuberização em *S. tuberosum*, *C. esculenta* e *C. scolymus* (Koda, 1992). Contudo, poucos relatos são dedicados aos seus efeitos na micropropagação do alho, sobretudo, no cultivo de meristemas com o objetivo de recuperar plantas livres de vírus.

Estudos sobre efeitos da aplicação exógena de ABA para micropropagação de várias espécies apontam evidências do seu envolvimento no processo de formação de órgão de reservas (Kim et al., 1994; Alizadeh, 1998; Yamazaki et al., 1999; Sato et al., 2001), podendo exercer efeitos estimulatórios em vários níveis: morfológicos, fisiológicos, celulares e moleculares (Parthier et al., 1992).

Alizadeh et al. (1998) observaram forte efeito inibitório do ABA na micropropagação de *Dioscorea composita*, porém, com a presença de microtubérculos na base das plantas, fato que não foi observado no trabalho de Sato et al. (2001) na regeneração *in vitro* de *M. sculenta*. Pilet & Barlow (1987) apontam também o ABA como um inibidor do crescimento da raiz em sistemas de cultivo *in vitro*, contrariando resultados de estudos anteriores que mostram aumento no crescimento da raiz em presença do ABA, especialmente, quando usado em baixas concentrações (Yamaguchi & Street, 1977). Apesar das evidências demonstradas em outras espécies formadoras de órgãos de armazenamento, ainda não há um consenso científico sobre o envolvimento do ABA na indução e desenvolvimento de bulbos de alho.

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

Foi demonstrado por Zel et al. (1997) absoluta dependência da sacarose para formação de bulbos na base de plantas micropropagadas *in vitro*. Esses autores verificaram se a combinação de AJ com alta concentração de sacarose poderia induzir a formação de bulbos a partir de fragmentos do disco basal de bulbilhos de alho e demonstraram que a adição de AJ no meio de cultura com 8% de sacarose foi superior na formação de bulbo.

Nessa mesma linha de estudo, Ravnikar et al. (1993) relataram um efeito sinérgico entre AJ e sacarose, apenas em relação ao número de bulbos formados, não afetando o seu diâmetro, porém, maior concentração de sacarose (8%), por si só, aumentou em 20% o diâmetro do bulbo em meio sem a presença de AJ. Após o desenvolvimento inicial de plântulas de alho em meio contendo 2iP, Torres et al. (2000) obtiveram bulbilhos com diâmetro entre 5 a 8 mm em meio MS suplementado com 6% de sacarose. O efeito estimulante da alta concentração de sacarose na formação de bulbo também foi observado para *A. cepa* (Keller, 1993).

O processo de bulbificação de alho (*A. sativum*) parece ser controlado por fatores ambientais, principalmente fotoperíodo e temperatura, que regulam os níveis endógenos de substâncias de crescimento. Temperatura baixa no início do processo e dias longos favorecem a bulbificação, enquanto dias curtos com temperaturas elevadas retardam ou inibem este 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). Estes fatores não só regulam as taxas de crescimento, mas também a transição entre diversas fases vegetativas e reprodutivas durante o desenvolvimento (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 de forma convencional no campo. Contudo, a temperatura e o regime de luz das salas de crescimento, na maioria dos laboratórios de cultura de tecidos de plantas, são padronizadas em função do trabalho com variado número de espécies. Normalmente, a temperatura é regulada em $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, e o fotoperíodo em 16 horas/luz. Dessa forma, para que ocorra o desenvolvimento de plantas de alho nessa condição considerada padrão, é imperativo que se faça a vernalização dos bulbilhos fornecedores de meristemas, visto que

esta técnica pode substituir as principais exigências climáticas dessa espécie e estimular a bulbificação (Filgueira, 1992), particularmente das cultivares de ciclo tardio do grupo nobre.

Na avaliação de períodos de vernalização de bulbilhos de alho no pré-cultivo de meristemas, visando suprir a demanda por baixas temperaturas, em condições de cultivo *in vitro*, foi constatado que 60 e 90 dias de vernalização sob temperatura de 4 a 7°C, são os melhores tratamentos, por promoverem o maior número de bulbilhos por explante e o incremento da massa fresca (Yuri et al., 2005). Estes resultados são relevantes, visto que devemos levar em consideração que entre os entraves da limpeza de vírus por meio da cultura de meristemas, a baixa taxa de multiplicação dos explantes e o tamanho e peso reduzido do bulbo produzido, estão entre os fatores mais limitantes.

Como evidenciado anteriormente, plantas de alho cultivadas no campo sob condição ambiental desfavorável, são incapazes de diferenciar células localizadas nas axilas de folhas, conseqüentemente, não formam bulbos completos (constituídos por bulbilhos). Em plantas de alho regeneradas *in vitro* a partir de meristemas caulinares, este fato se constitui também num fator limitante e um grande desafio na micropropagação do alho, visto que, a diferenciação em bulbos regenerados *in vitro*, proporcionaria um aumento significativo no rendimento de bulbilhos-sementes.

Este trabalho teve os seguintes objetivos: i) avaliar a qualidade de bulbilhos de alho utilizados como fontes de meristemas, ii) avaliar os efeitos de concentrações e tipos de reguladores de crescimento e de carboidratos solúveis na indução de bulbos e, iii) avaliar o tempo de vernalização de bulbilhos doadores de meristemas e as condições ambientais durante as etapas de crescimento das plantas *in vitro*, especialmente, na fase de formação do bulbo.

Amostras de plantas provenientes desses ensaios serão utilizadas no capítulo seguinte para analisar as alterações endógenas de carboidratos solúveis e de Ácido abscísico, bem como, o envolvimento desses compostos no processo de bulbificação de alho.

2. Material e Métodos

Implantação dos experimentos

Foram conduzidos cinco experimentos no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Epagri/Estação Experimental de Caçador

(Caçador/SC). Em todos os experimentos, foram utilizados bulbilhos de alho da cultivar “Jonas” (pertencente ao grupo de cultivares nobre), como fontes para extração dos meristemas.

A concentração única de BAP ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$), indicada para o desenvolvimento inicial de ápices caulinares nos experimentos deste trabalho, foi ajustada como estratégica para evitar riscos durante o processo de regeneração, tais como: vitrificação ou hiper-hidricidade dos explantes, muito comum com o uso de altas concentrações deste fitorregulador (Ivanova et al., 2006). Além disso, ressalta-se que o foco principal deste trabalho é voltado, principalmente, para o entendimento do processo da bulbificação, promovida numa fase posterior ao desenvolvimento inicial dos explantes.

Experimento 1: Efeito do tamanho do bulbilho fonte de meristema no crescimento de plantas de alho *in vitro*.

Meristemas com até dois primórdios foliares foram excisados de bulbilhos, de tamanho pequeno (1 a 2g), médio (3 a 4g) e grande (5 a 6g), previamente desinfestados em álcool 70% (1 minuto) e hipoclorito de sódio 1,5% (20 minutos), seguido de tríplice lavagem em água destilada esterilizada. Os meristemas foram dissecados e extraídos de cada categoria de bulbilho, e submetidos a duas fases de cultivo *in vitro*, a primeira para introdução do meristema em meio de cultura para o desenvolvimento inicial da planta (Fase de iniciação), e na segunda fase para o crescimento da planta, enraizamento e indução de bulbos (Fase de bulbificação).

Fase de iniciação - Para o crescimento inicial, os meristemas foram introduzidos em tubos de ensaio (15 mm x 100 mm) com 3 ml de meio MS (Murashige & Skoog, 1962), com redução de dois terços da concentração salina (MS/3), suplementado de vitaminas (Tiamina, Piridoxina, Glicina e Ácido Nicotínico), Mio-Inositol (100 mg L^{-1}), sacarose (3%), e 6-benzilaminopurina ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$), 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 $25 \pm 2^\circ \text{C}$, e fotoperíodo de 16h/luz e intensidade luminosa ajustada para 60 a $70 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de lâmpadas fluorescentes brancas.

Fase de bulbificação – As plantas, em fase inicial de desenvolvimento foram transferidas individualmente para tubos de ensaio (20mm x 150mm) contendo 8 ml de meio MS, suplementado de vitaminas, Mio-

Inositol (100 mg L^{-1}), sacarose (3%), 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.

Os tratamentos foram constituídos pelas três categorias de peso dos bulbilhos. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo estabelecidas para a fase de iniciação, durante 80 dias.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 20 repetições por tratamento. Cada repetição foi constituída de um tubo de ensaio com um meristema.

Experimento 2: Efeito do tipo e da concentração de reguladores de crescimento na indução de bulbos de alho *in vitro*.

Fase de iniciação - a assepsia dos bulbilhos fornecedores de meristemas e as condições de cultivo foram as mesmas descritas para o experimento 1.

Fase de bulbificação - Após 30 dias, as plantas em fase inicial de desenvolvimento, foram transferidas individualmente para tubos de ensaio (20mm x 150mm) contendo 8 ml de meio MS, suplementado de vitaminas, Mio-Inositol (100 mg L^{-1}), sacarose (3%), e dos seguintes reguladores de crescimento de plantas: AIA (Ácido Indolacético) (0; 1,07; 2,69 e $5,37 \text{ } \mu\text{M}$), AIB (Ácido Indolbutírico) (0; 0,49; 0,98 e $2,46 \text{ } \mu\text{M}$), ANA (Ácido Naftalenoacético) (0; 1,07; 2,69 e $5,37 \text{ } \mu\text{M}$), AJ (Ácido Jasmônico) (0; 1,0; 5,0 e $10,0 \text{ } \mu\text{M}$) e ABA (ácido abscísico) (0; 0,38; 1,89; e $3,78 \text{ } \mu\text{M}$). Para cada regulador de crescimento testado, os tratamentos foram constituídos pelos níveis de concentração. As culturas foram mantidas em sala de crescimento, nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo estabelecidas para o experimento 1. Em ambas as fases de cultivo, o pH dos meios de cultura foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem a 1,5 atm por 15 minutos.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento. Cada repetição foi constituída de um tubo de ensaio com um meristema introduzido. Os reguladores de crescimento foram analisados individualmente, como experimentos distintos.

Experimento 3: Efeito do tipo e da concentração de carboidratos na indução de bulbos de alho *in vitro*.

Assim como nos experimentos anteriores, a forma de assepsia dos bulbilhos, as condições de cultivo na fase de iniciação e o ambiente da sala de crescimento do laboratório foram as mesmas. Na fase de bulbificação, as fontes de carboidratos sacarose, glicose e frutose foram testadas no meio de cultura nas concentrações de 0, 3, 6, 9 e 12%, sendo os demais componentes do meio mantidos igualmente ao dos experimentos anteriores. Os tratamentos foram constituídos dos níveis de concentração de cada tipo de carboidrato utilizado. O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento. Cada repetição foi constituída de um tubo de ensaio com um meristema introduzido.

Experimento 4: Efeito do tempo de vernalização de bulbilhos fontes de meristemas e do fotoperíodo na indução de bulbos de alho *in vitro*.

Para a execução deste experimento, o processo de assepsia, a temperatura da sala de crescimento e a composição dos meios de cultura, nas duas fases de cultivo, foram as mesmas estabelecidas para o experimento 1. Na fase de iniciação, os meristemas foram introduzidos individualmente em tubos de ensaio (15 mm x 100 mm) com 3 ml de meio MS/3, e na fase de bulbificação as plantas foram introduzidas em frascos de vidro contendo 20 ml de meio MS.

Como fonte de meristemas foram utilizados bulbilhos vernalizados por períodos de 0, 30, 60 e 90 dias, em câmara fria a +4°C. Os meristemas provenientes dos bulbilhos vernalizados foram introduzidos *in vitro*, e mantidos sob condições de fotoperíodo curto (FC) de 11 horas/luz, ou de fotoperíodo longo (FL) de 16 horas/luz, ambos sob intensidade luminosa de 60 a 70 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de lâmpadas fluorescentes brancas.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 4 (2 regimes de fotoperíodo e 4 períodos de vernalização), com 10 repetições por tratamento. Cada repetição foi constituída de um frasco de vidro com três plantas, sendo que os valores numéricos de cada variável analisada foram obtidos a partir das médias de três plantas.

Experimento 5: Efeito da temperatura e do fotoperíodo na diferenciação de gemas e no crescimento de bulbos de alho *in vitro*.

Os procedimentos iniciais adotados neste experimento são os mesmos estabelecidos nos experimentos anteriores. Os meristemas foram introduzidos em meios de cultura e submetidos a duas fases de cultivo.

Fase de iniciação - para o crescimento inicial, os explantes foram introduzidos em tubos de ensaio (15 mm x 100 mm) com 3 ml de meio MS/3, suplementado de vitaminas, Mio-Inositol (100 mg L^{-1}), sacarose (3%), e BAP ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) e geleificado com ágar (0,6%). As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de $20 \pm 2^\circ \text{C}$, e fotoperíodo de 11h/luz.

Fase de bulbificação - após 30 dias em meio de iniciação, as plantas foram transferidas para frascos de vidro contendo 20 ml de meio MS, suplementado de vitaminas, Mio-Inositol (100 mg L^{-1}), sacarose (3%), e ANA ($0,2 \text{ mg L}^{-1}$). Em seguida as culturas foram distribuídas em câmaras de crescimento, tipo BOD, sob diferentes temperaturas (5, 10, 15, 20 e 25°C) e fotoperíodo (curto: 11 horas/luz e longo: 16 horas/luz), permanecendo nessas condições durante 30 dias. Completado este período, as culturas retornaram para sala de crescimento com temperatura de $20 \pm 2^\circ \text{C}$.

Em ambas as fases de cultivo, o pH dos meios de cultura foram ajustados para 5,8, antes da autoclavagem a 1,5 atm por 15 minutos, e a intensidade luminosa nas câmaras de crescimento ajustada para 60 a $70 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de lâmpadas fluorescentes brancas.

Cada combinação de nível de temperatura com nível de fotoperíodo foi analisada individualmente, como experimentos distintos. Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento. Cada repetição foi constituído de um frasco de vidro com três plantas introduzidas, sendo que os valores numéricos de cada variável analisada foram obtidos a partir das médias de três plantas.

Análises estatísticas

Os dados tabulados de todos os experimentos foram submetidos às análises de variância (teste F), exceto às variáveis número de bulbos por planta e porcentagem de bulbificação que foram submetidas à análise não paramétrica (teste Kruskal-Wallis) por não terem apresentado distribuição normal para nenhum dos fatores testados. Foi utilizado o programa SAS (versão 9.0), e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Para garantir o número suficiente de repetições, estabelecidas para cada experimento, foram introduzidos, no mínimo, cinco unidades experimentais adicionais para cada repetição.

As variáveis analisadas foram: número de bulbos por planta, porcentagem de bulbificação, diâmetro de bulbo, massa fresca de bulbo, altura de plantas, número de raízes por planta e número de folhas por planta.

3. Resultados e Discussão

3.1. Efeito do tamanho do bulbilho fonte de meristemas no crescimento de plantas de alho *in vitro*.

Os resultados demonstraram que os bulbilhos de alho grandes, com peso entre 4 a 5g, foram as melhores fontes doadoras de ápices caulinares para regeneração de plantas de alho *in vitro*, pois possibilitaram a formação de bulbos de maior peso e diâmetro, sendo essas as únicas variáveis onde ocorreram efeitos significativos de tratamento (Tabela 1).

Tabela 1- Resumo das análises de variância e não paramétrica para número de bulbos por planta, bulbificação, diâmetro de bulbo e massa fresca de bulbo, em função do tamanho de bulbilhos de alho cultivar “Jonas” utilizados como fontes de explantes, cultivados em meio de cultura de Murashige e Skoog (1962), durante 110 dias. Caçador, SC, 2011.

Tamanho do bulbilho	Número de bulbos por planta	Porcentagem de bulbificação (%)	Diâmetro de bulbo (mm)	Massa fresca de bulbo (mg)
Grande	1,50	100,0	5,87 a	226,40 a
Médio	1,55	100,0	5,68 a	188,40 b
Pequeno	1,60	100,0	5,37 b	190,06 b
Média	1,55	100,0	5,64	201,62
Teste F	-	-	11,04 **	10,41 **
Teste de Kruskal-Wallis	0,22 ns	-	-	-
C.V. (%)	37,0	0,0	6,1	4,3

** Teste F significativo ($P \leq 0,01$); ns = teste não significativo ($P > 0,05$); Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

Este fato é relevante na micropropagação do alho, visto que, em bulbilhos maiores a excisão do meristema poderá ser realizada com maior precisão, no entanto, a manipulação de material vegetal de grandes proporções, mesmo em ambiente asséptico, pode favorecer também uma maior taxa de contaminação das culturas.

3.2. Efeito do tipo e da concentração de reguladores do crescimento de plantas na indução de bulbos de alho *in vitro*.

Devido ao baixo número de concentrações dos RCPs utilizadas, e ao fato de as mesmas não serem equidistantes, os ajustes para as regressões polinomiais não foram significativos. Assim, a comparação de médias pelo teste de Tukey apenas, indicou ser a análise mais adequada.

O melhor resultado para número de bulbos por planta (1,6) e porcentagem de bulbificação (100%), foi observado quando se aplicou 1,07 μM de ANA, seguido do AJ que adicionado ao meio de cultura na concentração de até 5 μM promoveu incrementos dessas duas variáveis. (Tabela 2). De um modo geral, essas duas variáveis diminuíram com o uso de concentrações crescentes dos RCPs, chegando a inibi-las completamente com o uso de ABA na concentração de 3,78 μM .

Não há ainda um consenso científico sobre o envolvimento do ABA na indução e formação de órgãos de armazenamento, incluindo bulbos em espécies do gênero *Allium*. Kim (1994) verificou que a adição de ABA em meio de regeneração de plantas de *Lillium speciosum*, causou inibição do crescimento da parte aérea, porém, não impediu a formação de bulbos nessa espécie. Contrapondo esta afirmativa, Yamasaki et al. (1999) relatam que o ABA não está diretamente associado com a indução de bulbos em plantas de *A. wakagi* micropropagadas *in vitro*.

Em espécies de outros gêneros, como em *Hyacinthus orientalis*, a regeneração e crescimento de bulbilhos diminuíram proporcionalmente com aumento da concentração de ABA (Pierik & Steegmans, 1975), fato igualmente observado por Cheesman et al. (2010) em *E. Zambesiaca*. No presente trabalho o ABA apresentou efeitos menos satisfatórios em relação aos outros RCPs, tendo o maior número de bulbos (0,7) e a máxima porcentagem de bulbificação (60%), obtidos com o menor nível de concentração utilizada (0,38 μM).

Tabela 2 – Efeito da concentração dos reguladores de crescimento AIA, AIB, ANA, ABA e AJ nas variáveis número de bulbos por planta, porcentagem de plantas com formação de bulbos, diâmetro de bulbo, massa fresca de bulbo, altura de plantas, número de raízes por planta e número de folhas por planta de alho cultivar Jonas, após 110 dias de cultivo *in vitro*, em meio de cultura MS. Caçador, SC, 2011.

Concentração de RCPs (μM)	Número de bulbos por planta ¹	bulbificação (%) ¹	Diâmetro de bulbo (mm) ²	Massa fresca de bulbo (mg) ²	Altura de plantas (cm) ²	Número de raízes por planta ²	Número de folhas por plantas ²
Experimento 1 (AIA)							
0	0,40 β	30,0 β	3,88 c	155,2 c	4,70 d	1,00 c	3,00 b
1,07	0,90 $\alpha\beta$	70,0 $\alpha\beta$	6,10 a	197,2 a	9,34 c	9,10 a	4,20 a
2,69	1,20 α	100,0 α	5,54 b	188,2 ab	11,25 b	8,80 a	4,20 a
5,37	0,50 $\alpha\beta$	40,0 $\alpha\beta$	5,26 b	179,2 b	12,64 a	5,40 b	4,10 a
CV (%)	47,2	31,4	5,8	6,2	5,1	22,1	19,3
Experimento 2 (AIB)							
0	0,40	30,0	3,88	155,2 c	4,70 c	1,00 c	3,00 b
0,49	0,80	60,0	4,20	182,7 a	11,50 a	8,10 a	4,10 a
0,98	0,40	40,0	3,92	161,2 bc	11,94 a	6,90 a	3,90 a
2,46	0,20	10,0	4,10	177,5 ab	6,53 b	3,60 b	2,80 b
CV (%)	48,1	33,0	7,8	4,9	9,7	27,7	17,7
Experimento 3 (ANA)							
0	0,40 β	30,0 β	3,88 b	155,25 c	4,70 c	1,00 b	3,00 b
1,07	1,60 α	100,0 α	6,37 a	213,00 a	9,77 b	7,30 a	3,90 a
2,69	1,00 $\alpha\beta$	70,0 $\alpha\beta$	6,33 a	205,40 a	10,29 ab	7,10 a	4,33 a
5,37	0,70 $\alpha\beta$	60,0 $\alpha\beta$	4,04 b	169,29 b	10,83 a	7,80 a	4,00 a
CV (%)	28,3	65,9	4,9	3,4	6,2	19,2	17,2
Experimento 4 (ABA)							
0	0,40 $\alpha\beta$	30,0 $\alpha\beta$	3,88 a	155,25	4,70 a	1,00 c	3,00 a
0,38	0,70 α	60,0 α	3,47 b	145,43	5,16 a	3,90 b	3,40 a
1,89	0,30 $\alpha\beta$	30,0 $\alpha\beta$	3,57 ab	143,33	4,11 b	5,50 a	2,70 ab
3,78	0,00 β	0,00 β	nd	nd	2,83 c	1,90 c	1,67 b
CV (%)	85,0	72,7	6,4	4,8	10,4	36,9	23,2
Experimento 5 (AJ)							
0	0,40 β	30,0 β	3,88 b	155,25 b	4,70 c	1,00 b	3,00 ab
1	0,60 $\alpha\beta$	60,0 $\alpha\beta$	3,27 c	140,00 c	7,53 a	2,30 b	3,40 a
5	1,40 α	100,0 α	5,38 a	215,60 a	7,39 a	5,60 a	3,20 a
10	0,70 $\alpha\beta$	50,0 $\alpha\beta$	3,56 bc	104,00 d	5,43 b	6,20 a	2,20 b
CV (%)	44,1	73,5	4,8	4,0	7,0	49,5	23,7

Teste χ^2 significativo ($P \leq 0,05$); ²⁾ Teste F significativo ($P \leq 0,05$); nd não determinado. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro. Médias seguidas pela mesma letra grega na coluna não se diferem pelo teste de Kruskal-Wallis duas a duas, a 5% de probabilidade de erro. RCPs: reguladores de crescimento de plantas; AIA: ácidoindolacético; AIB: ácidoindolbutírico; ANA: ácidonaftalenoacético; ABA: ácido abscísico; AJ: ácido jasmônico.

Houve efeito significativo das concentrações dos RCPs para as demais variáveis analisadas pelo teste F ($P_{5\%}$). Novamente o ANA, na concentração de 1,07 μM , promoveu o melhor resultado, particularmente para as variáveis diâmetro e massa fresca do bulbo. Verificou-se, ainda em relação ao ANA, que nas variáveis número de raízes por planta e número de folhas por planta, as concentrações utilizadas resultaram em diferenças significativas apenas em relação ao tratamento controle. Apesar da ausência de RCP no meio de cultura (tratamento controle), houve resposta no crescimento para a maioria das variáveis estudadas. De acordo com Kerbauy (1999), ápices caulinares possuem competência e determinação para crescimento, desde que sejam fornecidas as condições necessárias de nutrição e luminosidade. Segundo esse mesmo autor, auxinas e citocininas endógenas são sintetizadas pelos primórdios foliares dos ápices caulinares e radícula, respectivamente, e podem suprir a demanda para crescimento e enraizamento.

As auxinas AIA e AIB promoveram aumentos satisfatórios do número de raízes por planta em concentrações mais baixas. Entretanto, ocorreram diminuições significativas sob o efeito de concentrações mais elevadas, particularmente com o suplemento de 2,46 μM de AIB no meio de cultura, que ainda resultou num expressivo número de plantas com formação de calo na base. A promoção de enraizamento por auxinas também tem sido relatado com sucesso para outras espécies bulbosas, como *Narcissu spp.* (Hosoki & Asahira, 1980; Seabrook, 1990), e para raízes de *M. esculenta* (Sato et al., 2001). Neste trabalho, consideramos que os níveis das auxinas contidas no meio para indução de bulbo, proporcionaram tanto o bom crescimento do sistema radicular quanto da parte aérea (Figura 1).

O meio com ausência de auxinas (tratamento controle) promoveu maior crescimento da parte aérea (4,7 cm) em relação as raízes. Em outras espécies regeneradas *in vitro*, como em *Rubus spp.*, a ausência de auxina em meio de cultura não inibi o número e alongamento das raízes (Radmann et al., 2003). Esta condição, segundo George et al. (2008), pode também estimular o crescimento *in vitro* da parte aérea de plantas, fato não verificado no presente estudo. É comum ocorrer respostas diferenciadas à auxina entre e dentro de espécie. Hussey (1982) relatou a variação genética na sensibilidade de cultura de brotos de *Narcissus spp.* para reguladores de crescimento das plantas, entretanto, diversas cultivares dessa mesma espécie, utilizadas nos experimentos de Chow et

al. (1992), responderam de forma semelhante aos tratamentos instituídos.

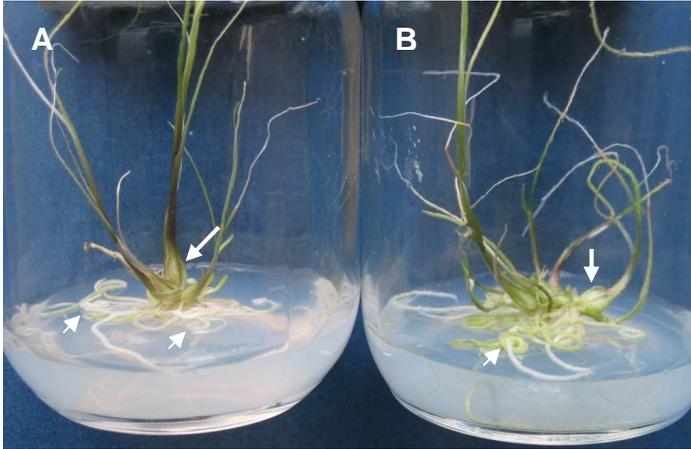


Figura 1 - Plantas de alho cultivar Jonas na fase de bulbificação, cultivadas em meio de MS contendo AIA (A) e ANA (B), com a indicação de formação de microbulbos e raízes na base das plantas (seta branca). Caçador, SC, 2011.

O ABA adicionado no meio de cultura de bulbificação promoveu o menor crescimento da parte aérea, revelado pela altura de plantas e número de folhas, o que sugere um efeito inibitório desse hormônio no crescimento de plantas de alho *in vitro*. A amplitude de variação da altura de plantas foi de 2,33 cm, com o maior valor de 5,16 cm, alcançado com a aplicação de 0,38 μM de ABA, porém, não diferiu do tratamento controle (4,7 cm).

É reconhecido que os jasmonatos apresentam ações biológicas bastantes semelhantes atribuídas ao ácido abscísico, como efeito inibitório do crescimento vegetal (Parthier et al., 1992). No entanto, da mesma forma descrita para o ABA, os jasmonatos, dependendo da concentração empregada, podem também exercer efeitos estimulatórios em vários níveis: morfológicos, fisiológicos, celulares e moleculares (Parthier et al. 1992).

No presente estudo, o aumento das concentrações do ácido jasmônico até o nível de 5 μM apresentou efeito positivo no crescimento da maioria das variáveis analisadas. Por outro lado, a

concentração de 10 μM não induziu os efeitos esperados, inclusive, inibindo o crescimento da parte aérea, caracterizado pelo baixo número de folhas e redução na altura das plantas. Há relatos em que o Ácido Jasmônico aumentou a indução e tamanho de bulbos em *A. sativum* cv. Ptuj (Ravnikar et al., 1993) e *N. triandrus* (Santos & Salema, 2000). Este mesmo hormônio, porém, não estimulou formação de bulbo em *E. zambesiaca* em nenhuma concentração utilizada (Cheesman et al., 2010).

Diferentemente do resultado obtido por Zel et al. (1997), no qual a formação de raízes em plantas de alho regeneradas a partir de fragmentos do disco caulinar foi inibida na presença de AJ, no presente trabalho, o número de raízes por planta manteve incrementos até o nível de 10 μM de AJ. Estas variações podem ser atribuídas ao fato de diferentes espécies e/ou seções de vários órgãos, diferirem em sua habilidade de produzir substâncias de crescimento endógenas ou estas diferirem na sua concentração no momento do isolamento (Hempel, 1979).

Com o objetivo de testar o efeito da citocinina no meio de bulbificação, uma concentração fixa de 4,44 μM de BAP foi combinada com AIA, AIB, ANA e AJ nas concentrações que promoveram os melhores resultados no experimento anterior (Tabela 3).

A adição de BAP no meio de cultura parece ter promovido um efeito sinérgico com AIB, ANA e AJ sobre a variável número de bulbos por planta, sendo o efeito mais notável quando a mistura foi de BAP com AJ, promovendo um incremento de 23,5% sobre esta variável. Entretanto, observou-se uma redução significativa do diâmetro e do peso de massa fresca de bulbos quando BAP foi adicionado ao meio com ANA e AJ, ao passo que, a combinação BAP + ANA promoveu aumento de peso da massa fresca de bulbo na ordem de 10,2%.

Efeitos favoráveis da interação de BAP com auxinas também foram observados em outras espécies. Dabrowski et al. (1992) utilizaram auxinas com produção de bons resultados para a formação de bulbos de *Lilium*, no entanto, a adição de citocininas no meio aumentou a capacidade de regeneração de explantes. Resultados semelhantes aos que foram observados no presente trabalho, Yi et al. (2002) constataram que o meio com ANA associado à BAP tiveram a maior taxa de crescimento e regeneração de bulbilhos em *H. orientalis* comparado a uma mistura de AIA com a mesma citocinina.

Tabela 3 – Efeitos da combinação do BAP com as auxinas AIA, AIB, ANA, e AJ sobre as variáveis número de bulbos por planta, porcentagem de plantas com formação de bulbos, diâmetro de bulbo, e massa fresca de bulbo de alho cultivar ‘Jonas’, após 110 dias de cultivo *in vitro*. Caçador, SC, 2011.

Reguladores de crescimento (μM)					Número de bulbos por planta ¹	Bulbificação (%) ²	Diâmetro de bulbo (mm)	Massa fresca de bulbo (mg)
BAP	AIA	AIB	ANA	AJ				
0	0	0	0	0	0,50 β	0,40 β	4,16 d	136,2 e
0	2,69	0	0	0	1,20 α	100,0 α	5,54 bc	188,2 c
4,44	2,69	0	0	0	1,00 $\alpha \beta$	100,0 α	5,93 b	209,5 a
0,0	0	0,49	0	0	0,80 $\alpha \beta$	60,0 β	4,20 d	182,7 d
4,44	0	0,49	0	0	0,90 $\alpha \beta$	80,0 $\alpha \beta$	4,28 d	186,9 cd
0	0	0	1,07	0	1,60 α	100,0 α	6,37 a	213,0 a
4,44	0	0	1,07	0	1,80 α	100,0 α	5,76 b	196,1 b
0	0	0	0	5,0	1,30 β	100,0 α	5,38 c	215,6 a
4,44	0	0	0	5,0	1,70 α	100,0 α	4,78 e	211,1 a
CV (%)					41,3	37,5	22,2	3,7

¹⁾ Teste F significativo ($P \leq 0,01$); ²⁾ Teste χ^2 significativo ($P \leq 0,01$). Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro. Médias seguidas pela mesma letra grega na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis duas a duas, a 5% de probabilidade de erro.

É geralmente aceito que a proporção de citocinina para auxina é um determinante crítico da organogênese em planta de cultura de tecidos (Xu et al., 2008). A dependência de citocinina para iniciação de brotos, nas fases iniciais de crescimento, já é um fato confirmado na micropropagação do alho. Porém, efeitos estimulatórios sobre a produção de bulbos também foram detectados nos meios de cultura de bulbificação suplementados com BAP.

3.3. Efeito do tipo e da concentração de carboidratos na indução de bulbos de alho *in vitro*.

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

(Tabela 4). Em oposto ao verificado com o uso de frutose, o número de bulbos por planta reduziu à medida que a concentração de sacarose foi utilizada em níveis acima de 3%, apesar das diferenças não terem apresentado significância estatística. A alta concentração de carboidratos utilizada (120g L^{-1}) diminuiu significativamente o tamanho e peso de bulbos, no entanto, nessa concentração, as três fontes de carboidratos suportaram o crescimento de explantes e estimularam a bulbificação. Com relação aos efeitos da glicose, houve respostas significativas apenas para as variáveis diâmetro de bulbo, altura de plantas e número de folhas por planta, até o nível de 6%. Apesar de não significativo, houve uma tendência de incremento do número de bulbos por planta até a concentração mais alta desse monossacarídeo.

Parece haver uma tendência para a formação de órgãos de armazenamento na medida em que se aumenta a oferta de carboidratos em meios de cultura. Hauser & Horn (1991) observaram um incremento na indução e no peso de rizomas de *Sparaxis* com a aplicação de níveis crescentes de sacarose, de 2 a 10%. Em muitos casos, entretanto, pode haver uma inversão, onde o número ou tamanho dos órgãos de reserva são afetados, o que parece ter ocorrido no presente estudo, em relação ao uso de concentrações crescentes de sacarose. Isto também é observado em outras espécies. Em *W. vanderspuyiae* o aumento dos níveis de sacarose de 3% a 9% diminuiu a frequência de indução de rizomas, porém, teve peso de massa aumentada (Ascough et al., 2008). Em culturas de *Lachenalia spp.* o aumento da concentração de sacarose de 3% para 6% não aumentou a produção de bulbos, mas promoveu o aumento do seu tamanho (Slabbert & Niederwieser 1999). Estes autores relatam ainda que na concentração de 12%, além da frequência de indução, o crescimento do rizoma foi significativamente inibido.

Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho foram observados em outras espécies, em relação aos efeitos do uso de níveis crescentes de frutose sobre a indução de bulbos *in vitro*. Bach et al. (1992), testaram os efeitos de diferentes fontes de carboidratos sobre a formação de bulbos de *H. orientalis* usando folhas como explantes e constataram que meios com 30g L^{-1} de frutose produziram mais bulbilhos. O uso de concentrações crescentes dos monossacarídeos frutose e glicose, isoladamente, ou em mistura equimolar estimularam maior produção e acúmulo de massa seca de bulbos de *Narcissus spp.* (Staikidou et al., 2005). Em contribuição a esta constatação, Cheesman et al. (2010) relatam que a frutose foi o melhor carboidrato para indução de bulbilhos de *E. zambesiaca*, em particular a 30g L^{-1} .

Tabela 4 - Efeito das concentrações de sacarose, frutose e glicose nas variáveis número de bulbos por planta, porcentagem de plantas com formação de bulbos, diâmetro de bulbo, massa fresca de bulbo, altura de plantas, número de raízes por planta e número de folhas por planta de alho cultivar 'Jonas', após 110 dias de cultivo *in vitro*. Caçador, SC, 2011.

Carboidrato (%)	Número de bulbos por planta ¹	Bulbificação (%) ¹	Diâmetro de bulbo (mm)	Massa fresca de bulbo (mg)	Altura de plantas (cm)	Número de raízes por planta	Número de folhas por plantas
Sacarose							
0	0,60 β	60,0 α	3,80 d	66,1 c	5,12 d	2,60 b	2,30 c
3	1,60 α	100,0 α	5,64 c	220,4 b	10,16 b	6,80 a	3,90 ab
6	1,50 αβ	100,0 α	7,28 a	261,6 a	11,38 a	7,00 a	4,20 a
9	1,10 αβ	100,0 α	7,40 a	276,0 a	10,50 ab	6,83 a	4,10 ab
12	0,80 αβ	70,0 α	6,48 b	228,2 b	8,98 c	7,75 a	3,50 b
CV (%)	56,2	36,8	3,5	4,4	6,1	14,3	14,3
	*	*					
Frutose							
0	0,60 β	60,0 α	3,80 d	66,0 c	5,12 c	2,60 b	2,30 b
3	0,90 αβ	90,0 α	5,18 c	250,4 ab	10,92 b	5,80 a	4,00 a
6	1,30 αβ	90,0 α	6,42 ab	246,0 ab	11,66 a	5,60 a	3,60 a
9	1,80 α	100,0 α	6,98 a	261,6 a	12,16 a	6,80 a	3,80 a
12	1,60 α	100,0 α	6,14 b	220,8 b	13,14 a	7,20 a	4,20 a
CV (%)	58,1	34,7	5,4	9,3	8,5	19,9	17,5
	*	*					
Glicose							
0	0,6	60,0	3,80 cd	66,1 d	5,12 c	2,6 b	2,3 c
3	0,8	70,0	4,54 bc	243,0 a	7,85 b	6,6 a	3,4 b
6	0,7	60,0	5,80 a	248,0 a	10,74 a	6,6 a	4,3 a
9	1,1	100,0	4,76 b	178,6 b	10,84 a	6,8 a	4,1 ab
12	1,2	60,0	3,64 d	140,8 c	11,10 a	6,4 a	4,0 ab
CV (%)	26,9	64,9	9,5	9,8	7,8	15,2	16,2
	NS	NS					

¹⁾ Teste χ^2 significativo ($P \leq 0,05$); ²⁾ Teste F significativo ($P \leq 0,05$); NS: Teste F não significativo ($P > 0,05$). Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro. Médias seguidas pela mesma letra grega na coluna não se diferem pelo teste de Kruskal-Wallis duas a duas, a 5% de probabilidade de erro.

Uma possível razão para as respostas dessas espécies pode estar relacionada com a seleção da fonte de carbono pela planta. Ao selecionar uma fonte de carbono facilmente metabolizável, como frutose

ou glicose, a planta conserva a energia necessária para hidrolisar sacarose e disponibilizar energia para o crescimento (Smeekens, 2000).

Especulações existem sobre como a elevação de níveis de carboidratos impactam na formação e no crescimento de órgão de armazenamento. As principais hipóteses correntes são: (1) O aumento dos níveis de hidratos de carbono resulta na disponibilidade abundante de energia (melhora no fornecimento) que pode ser utilizada para a indução e crescimento, e (2) aumentar os níveis de carboidratos resulta no aumento da osmolaridade do meio, criando assim um tipo de “stress” no ambiente, que leva, como uma resposta, à indução de órgãos de armazenamento. Esta última questão tem sido pouco investigada em espécies bulbosas, entretanto, Staikidou et al. (2005) sugerem que o fornecimento de carboidratos pode ser mais importante do que a osmolaridade para a indução de bulbos. Pesquisas adicionais são necessárias para determinar se isto é verdadeiro para outros gêneros e espécies de famílias diferentes.

A análise de regressão polinomial revelou comportamento quadrático ($P \leq 0,05$), do diâmetro de bulbo, massa fresca de bulbo, altura de plantas, e número de folhas por planta, em função de concentrações de sacarose (Figura 2). Apesar de se tratar de fatores quantitativos, houve ajustes para regressão apenas para estas variáveis.

O modelo estimado permite afirmar que o máximo diâmetro (7,2mm), o máximo teor de massa fresca do bulbo (283,5 mg), a máxima altura de plantas (11,5 cm) e o máximo número de folhas por planta (4,3) seriam atingidos, teoricamente, com a concentração estimada de 8,1%; 7,8%; 7,1%, e 7,1% de sacarose, respectivamente.

Na Figura 3, são apresentados os resultados das análises de regressão, também de comportamento quadrático, para diâmetro de bulbo e massa fresca de bulbo, em função de concentrações de frutose. Os máximos valores com as respectivas concentrações estimadas de frutose (entre parênteses) foram: 6,7 mm de diâmetro (8,6%) e 278,8 mg de massa fresca do bulbo (7,6%).

Embora a frutose tenha demonstrado potencial para o crescimento de bulbos de alho *in vitro*, em concentrações mais elevadas, a sacarose proporcionou os resultados mais importantes no que se refere a taxa de bulbificação, apresentando taxa de 100% já a partir da concentração mínima utilizada (30g L^{-1}), o que é relevante do ponto de vista de custo na micropropagação.

Os resultados obtidos com concentrações elevadas de carboidratos em meios de cultura para bulbificação têm sido relatados com

freqüência para várias espécies bulbosas, particularmente quando a sacarose é a fonte principal de carbono. O aumento adicional no tamanho e peso do bulbo é desejável do ponto de vista prático na micropropagação, pois a produção de bulbos maiores evita perdas, muito comuns durante a aclimatização de plantas, além de favorecer o intercâmbio de germoplasmas (Illg, 1995). Contudo, isto pode apresentar algumas implicações para os sistemas de micropropagação dessas espécies.

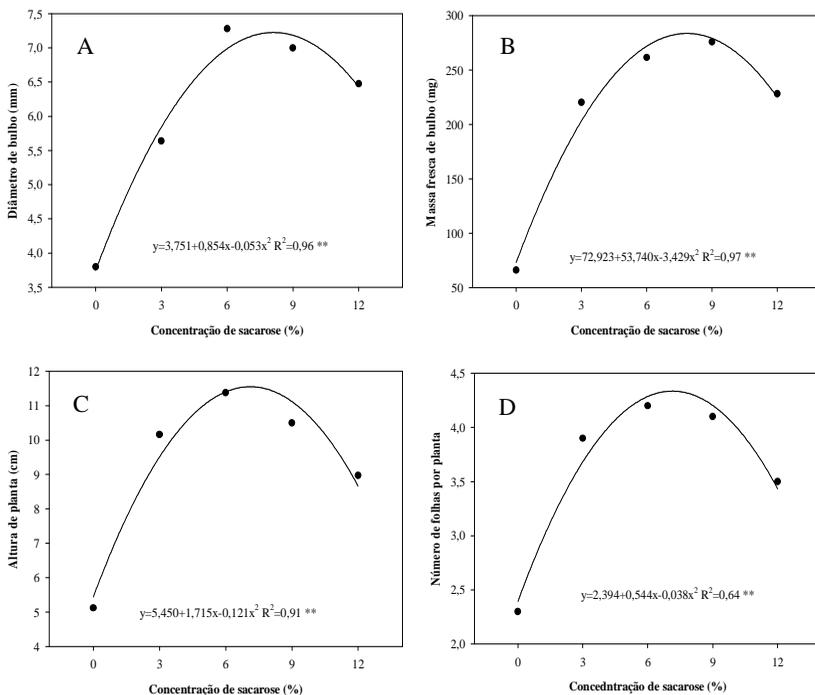


Figura 2 - Regressão polinomial para diâmetro de bulbo (A), massa fresca de bulbo (B), altura de plantas (C), e número de folhas por planta de alho cultivar 'Jonas' (D), em função de concentrações de sacarose.

As vantagens do aumento do tamanho podem ser compensadas por efeitos adversos sobre dormência, como uma relação entre o fornecimento de sacarose e dormência de bulbos que já foi demonstrada para espécies de *Narcissus spp.* Squires et al. (1991) relataram

retardamento de dormência de bulbos de *Narcissus ssp.* quando a oferta de sacarose foi aumentada em cultivo *in vitro*. Da mesma forma, bulbilhos de *N. bulbocodium*, aumentaram de tamanho por duas passagens em meio de cultura contendo 9% de sacarose, sem apresentar sinais de dormência, tendo na sequência desencadeado um processo precoce de florescimento (Santos et al., 1998). Longo (2009) observou um retardamento do início de senescência de plantas de alho cultivadas *in vitro*, associando esse fato ao fenômeno da dormência, devido ao fornecimento de altas concentrações de sacarose, que afetariam o conteúdo de outras substâncias na planta, e o fornecimento contínuo de outros nutrientes.

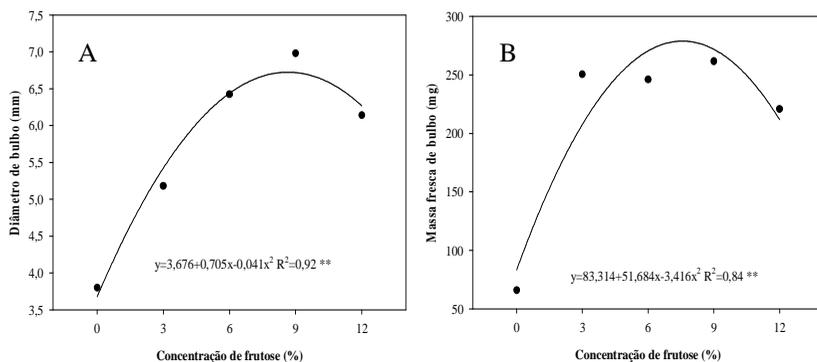


Figura 3 - Regressão polinomial para diâmetro de bulbo (A) e massa fresca de bulbo (B) de plantas de alho cultivar ‘Jonas’, em função de concentrações de frutose.

No presente trabalho, após um período de 60 dias de cura, detectou-se um elevado número de bulbilhos chochos (dados não tabulados) provenientes do cultivo em meio com concentração elevada de sacarose, entre 90 a 120g L⁻¹, (Figura 4). Este fato, também foi observado por Longo (2009) e, se constitui em mais um percalso no sistema de micropropagação do alho.

Os efeitos adversos de suplementos adicionais de sacarose em meios para regeneração de plantas de alho demonstraram ser relevantes, particularmente sobre o desenvolvimento da dormência e a qualidade dos bulbos. Assim, sugere-se mais pesquisas para esclarecimentos desse

fenômeno, objetivando melhorar o sistema para a produção de bulbos em grande escala.



Figura 4 - Microbulbos de alho cultivar Jonas, regenerados em meio de cultura sob diferentes concentrações de sacarose. Barra: 1,0 cm. Caçador, SC, 2011.

3.4. Efeito do tempo de vernalização de bulbilhos doadores de meristemas e do fotoperíodo na indução de bulbos de alho *in vitro*.

Na Tabela 5 é apresentado um resumo das análises de variância e não paramétrica, indicando uma maior importância da vernalização sobre os parâmetros de crescimento do bulbo.

Observou-se efeito simples da vernalização sobre o número de bulbos por planta e sobre o diâmetro de bulbos. 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 72,9 (≈ 73) dias de vernalização dos bulbilhos fornecedores de meristemas (Figura 5-A) e o diâmetro máximo de bulbo (6,6 mm) foi estimado com a aplicação de 44,8 (≈ 45) dias de vernalização dos bulbilhos (Figura 5-B).

Resultados semelhantes foram obtidos por Yuri et al. (2005) para cultivar de alho “Roxo Pérola de Caçador”, ao observarem um comportamento linear para número de bulbos em função do tempo de vernalização, sendo 90 dias o período que promoveu o maior incremento (1,81 bulbos). Por outro lado, o número de bulbos por planta observado no presente trabalho (1,79), é inferior ao observado no trabalho de Rossi

et al. (1995) que obtiveram uma proliferação no número de bulbos de 1:4 para cultivar de alho “Piacentiano Bianco”. Contudo, deve-se levar em conta que essa comparação diz respeito apenas à magnitude dos dados obtidos, uma vez que as cultivares supra-citadas não foram utilizadas no presente trabalho.

Tabela 5 – Resumo das análises de variância e não paramétrica para número de bulbos por planta, bulbificação, diâmetro de bulbo, massa fresca de bulbo, altura de plantas e número de folhas em função do fotoperíodo e do tempo de vernalização de bulbilhos de alho cultivar ‘Jonas’. Caçador, SC, 2011.

Níveis dos fatores	Número de bulbos por planta	Bulbificação (%)	Diâmetro de bulbo (mm)	Massa fresca de bulbo (mg)	Altura de plantas (cm)	Número de folhas por plantas
Fotoperíodo						
Dias curtos	1,20	78,3	5,20	194,7	9,74	4,4
Dias longos	1,40	85,0	5,38	199,7	9,56	4,4
Vernalização (dias)						
0	0,34 b	26,7 β	4,34 b	179,3	10,97	4,5
30	1,50 a	100,0 α	6,35 a	213,3	9,47	4,3
60	1,58 a	100,0 α	6,33 a	220,8	9,22	4,6
90	1,79 a	100,0 α	4,30 b	175,4	8,95	4,3
Média	1,30	81,7	5,33	197,2	9,65	4,4
Fotoperíodo (FP)	2,68 NS	-	3,24 NS	6,37 *	4,53 *	0,06 NS
Vernalização (V)	30,02 *	-	440,64 *	136,93 *	120,75 *	0,51 NS
FP x V	0,10 NS	-	1,75 NS	4,75 *	7,06 *	0,82 NS
Kruskal-Wallis	-	38,26 §§	-	-	-	-
C.V. (%)	28,9	17,7	3,3	3,2	2,7	14,9

* Teste F significativo ($P \leq 0,05$); §§ Teste χ^2 significativo ($P \leq 0,01$); NS: Teste F não significativo ($P > 0,05$). Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro. Médias seguidas pela mesma letra grega na coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis duas a duas, a 5% de probabilidade de erro.

Houve interação entre fotoperíodo e vernalização para massa fresca de bulbo e altura de plantas (Tabela 5), indicando dependência entre esses fatores. A massa fresca máxima estimada de bulbo (223,6 e 220,4 mg) foi obtida com 44,8 e 44,6 (≈ 45) dias de vernalização, respectivamente para dias curtos e dias longos (Figura 6-A), reduzindo conforme o aumento do período de vernalização a partir do valor estimado de 45 dias, mais sensível sob fotoperíodo curto. Este resultado, porém, é contrário ao que foi obtido por Yuri et al. (2005), quando concluíram que 90 dias em câmara frigorífica a $5 \pm 2^\circ\text{C}$ é o tratamento de

vernalização mais eficaz, por proporcionar, além do maior número de bulbos por ápices o maior peso de massa fresca total de bulbos.

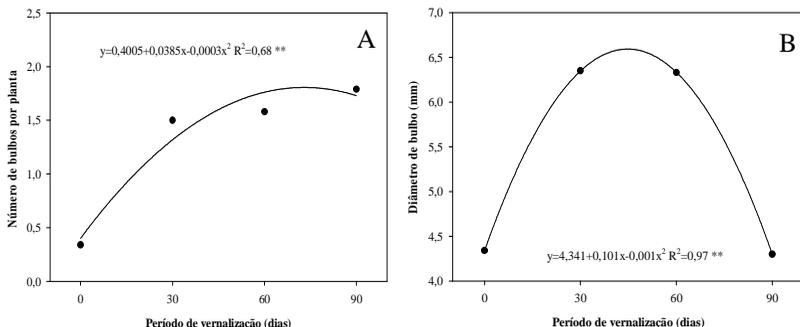


Figura 5 - Número de bulbos por planta (A) e diâmetro de bulbo (B) de alho cultivar ‘Jonas’ em função do período de vernalização dos bulbilhos fontes de meristemas. Os valores são médias dos dois fotoperíodos utilizados.

Outra constatação deste trabalho foi a diminuição na altura de plantas, observada conforme se aumentou o período de vernalização, nos dois regimes de fotoperíodo. Sob fotoperíodo curto reduziu e estabilizou-se a partir dos 63 dias de vernalização (valor estimado), enquanto, sob fotoperíodo longo, continuou diminuindo até 90 dias (Figura 6-B). Exceto para o controle, todos os tratamento proporcionaram bulbificação em 100% das plantas, independente do fotoperíodo utilizado, não havendo, portanto, variância que justificasse uma análise de regressão.

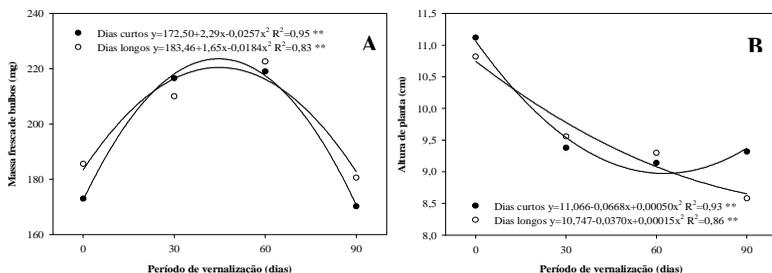


Figura 6 - Massa fresca de bulbo (A) e Altura de plantas (B) de alho cultivar “Jonas”, em função do fotoperíodo e do período de vernalização dos bulbilhos doadores de meristemas.

A vernalização de bulbilhos fornecedores de explantes para o cultivo de plantas de alho *in vitro* é indispensável para promover a indução e crescimento de bulbos, visto que as condições climáticas em ambientes de laboratório fogem do padrão exigido pela cultura do alho. Embora os resultados aqui apresentados sejam referentes a bulbos de alho provenientes da cultura de tecidos, em alguns aspectos os mesmos podem ser comparáveis à resultados de pesquisa realizadas a nível de campo. Por exemplo, a vernalização de bulbilhos-sementes reduziu a produção e peso médio de bulbos a campo (Carvalho et al. 1980; Silva et al., 2002), além disso, proporcionou redução no ciclo de várias cultivares, conforme observado por Zing (1963), Carvalho et al. (1980), Silva (1982) e Silva et al. (2002).

Um outro aspecto importante a ser destacado diz respeito à formação do bulbo em sistemas de cultivo. O desenvolvimento de um bulbo pode ser expresso pela razão bulbar (RB), que é a relação entre o diâmetro da base do pseudocaule e o maior diâmetro da base, ou seja, quanto menor for a razão bulbar, melhor será a conformação do bulbo.

Alguns autores consideram o valor de razão bulbar (0,5) como referência para indicar o início do processo de bulbificação, relatado para bulbos de cebola (Tsfay et al., 2011) e de alho (Burba, 1983). Segundo Mann (1952) a relação bulbar inferior a 0,5 indica intensificação na formação do bulbo e valores inferiores a 0,2 indicam final da bulbificação. 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*.

Na Figura 7 são apresentados os efeitos dos tratamentos na razão bulbar (RB) para as duas condições de fotoperíodo, também ilustrado na Figura 8. Verificou-se uma redução da razão bulbar à medida que se intensificou o tempo de vernalização dos bulbilhos. Nota-se que, independente do fotoperíodo, nas plantas provenientes de bulbilhos não vernalizados os bulbos não atingiram o valor referência de RB estabelecido para indicar o início da bulbificação. Por outro lado, aos 20 dias após a transferência, as plantas oriundas de bulbilhos vernalizados por 60 e 90 dias, cultivadas sob fotoperíodo curto, mostraram maior sensibilidade à vernalização, apresentando RB abaixo de 0,20 no final do ciclo.

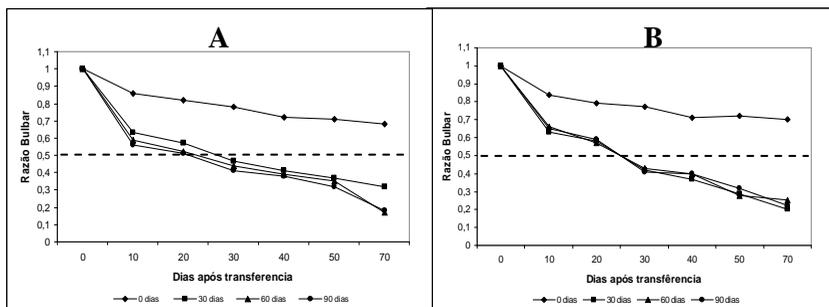


Figura 7 – Razão bulbar observada em plantas de alho cultivar “Jonas” cultivadas *in vitro*, sob dias curtos (**A**) e dias longos (**B**), a partir de meristemas extraídos de bulbilhos vernalizados por períodos de 0, 30, 60 e 90 dias em câmara fria a +4° C. A linha horizontal tracejada na altura do valor 0,5 sugere o ponto de início da bulbificação.

Coerente com os resultados do presente estudo, Silva et al. (2002) observaram resposta linear à intensidade de vernalização com redução da razão bulbar à medida que se intensificou o tempo. Portanto, os nossos resultados estão de acordo aos observados pelos autores. Estes resultados, porém, devem ser analisados com cautela, visto que outros fatores podem contribuir para afetar a conformação do bulbo, como o suplemento de carboidratos em meio de cultura (Longo, 2009), onde o aumento da oferta promoveu também um aumento da RB em níveis que comprometeram a qualidade dos bulbos.

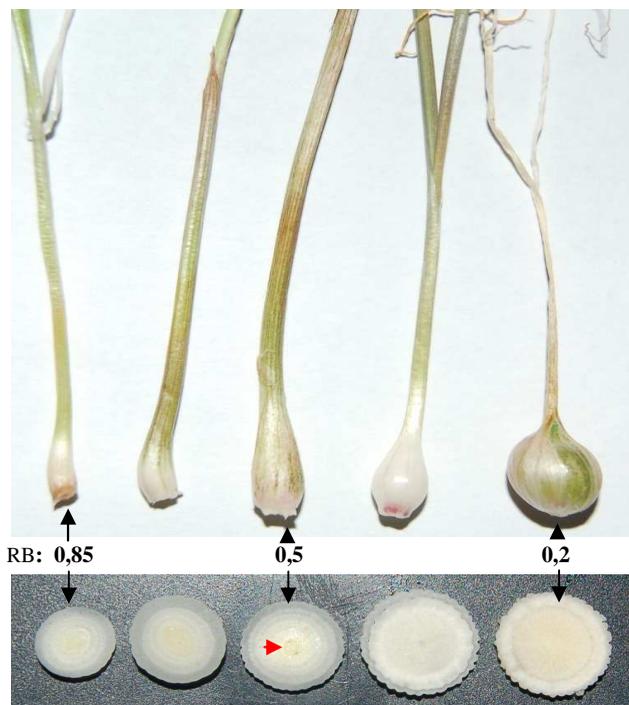


Figura 8 - Plantas de alho da cultivar “Jonas” micropropagadas a partir de meristemas extraídos de bulbilhos vernalizados durante 30 dias em câmara de fria a +4° C. As setas indicam diferentes valores de razão bulbar em diferentes estágios de desenvolvimento do bulbo. O início do acúmulo de reserva em um bulbo com razão bulbar 0,5 é indicado por seta. Caçador, SC, 2011.

3.5. Efeito da temperatura e do fotoperíodo na diferenciação de gemas e na indução de bulbos de alho *in vitro*.

Na Tabela 6 são apresentados os resultados das análises de variância das variáveis de crescimento de plantas de alho cultivadas *in vitro* sob diferentes regimes de temperatura e de fotoperíodo. Ocorreu bulbificação em 100% das plantas em todas as condições climáticas de cultivo, e em função disso, esta variável não foi submetida à análise estatística, já que não houve o efeito de tratamentos.

Nas temperaturas de 10°C e 15°C, o fotoperíodo influenciou significativamente nas variáveis diâmetro de bulbo e massa fresca de bulbo. Sob o efeito da temperatura de 10°C, houve um incremento do diâmetro e da massa fresca do bulbo de 14% e 7,5%, respectivamente, quando as plantas passaram a ser cultivadas sob fotoperíodo longo. Já na condição de 15°C, observou-se efeito significativo do fotoperíodo apenas para diâmetro de bulbo, apresentando um aumento de 7,5%, quando as plantas foram submetidas a fotoperíodo longo.

Em grande parte de gêneros e famílias investigadas, tem sido observado que a redução da temperatura do ambiente de cultivo promove indução de órgãos de reserva em várias espécies. As principais variáveis associadas com este tratamento são a extensão da redução e duração da exposição (Ascough et al., de 2008). Por exemplo, temperaturas são eficazes a partir de 4 °C para *Hyacinthus spp.* (Bach et al., 1992), 10°C para *Lachenalia spp.* (Slabbert & Niederwieser, 1999), 15°C para *Sparaxis spp.* (Hauser & Horn, 1991) e 20°C para *Gladiolus spp.* (Nhut et al. 2004) e para *Lillium spp.* (Yamagishi, 1998). Contudo, algumas espécies respondem diferentemente á variação da temperatura. Em *W. vanderspuyiae*, apesar da formação de rizomas ocorrer de forma bem sucedida na faixa de 10 a 20°C, não se verificou efeitos da variação de temperatura sobre outras três espécies estudadas, especialmente quando a temperatura da cultura foi reduzida (Ascough et al. de 2008).

A exemplo do que foi verificado com *Gladiolus spp.* (Nhut et al. 2004) e com *Lillium spp.* (Yamagishi, 1998), no presente trabalho, o *A. sativum* respondeu satisfatoriamente à redução da temperatura, quando os melhores resultados relacionados as variáveis de crescimento de bulbo foram observados sob temperatura de 20°C, comparado a temperatura padrão de 25°C.

Num contexto geral, evidenciou-se um efeito positivo do fotoperíodo longo sobre a maioria dos parâmetros de crescimento avaliados, nas diferentes temperaturas a que foram expostas as plantas no período entre o 30º ao 60º dia do ciclo de cultivo *in vitro*. Contudo, independente do fotoperíodo utilizado, aparentemente, a formação de bulbilhos maiores, com maior peso e com melhor formação ocorreu sob a temperatura de 20°C, mostrando ser esta a condição ambiental melhor, próxima do ótimo para indução e crescimento de bulbos de alho *in vitro*.

Tabela 6. Análise de variância para número de bulbos por planta, bulbificação, diâmetro de bulbo, massa fresca de bulbos, altura de plantas e número de folhas por planta de alho cultivar “Jonas” em função da temperatura e fotoperíodo no 30^o ao 60^o dias do ciclo de cultivo. Na última coluna, à direita, estão indicados o número/porcentagem de bulbos diferenciados por tratamento.

Tratamentos	Número de bulbos por planta	bulbificação (%)	Diâmetro de bulbo (mm)	Massa fresca de bulbo (mg)	Altura de plantas (cm)	Número de folhas por planta	Bulbos diferenciados (N ^o)
Temperatura 5° C							
Fotop. curto	1,43	100	5,9	246,3	7,94	4,2	16/58 (27,6%)
Fotop. longo	1,53	100	6,1	238,0	8,14	3,8	0
Teste F	0,45 NS	-	1,56 NS	1,20 NS	0,08 NS	1,14 NS	
C.V. (%)	1,35	0,0	0,30	4,56	0,18	0,02	
Temperatura 10° C							
Fotop. curto	1,44	100	4,46 b	182,2 b	9,10	4,0	23/43 (53,5%)
Fotop. longo	1,47	100	5,16 a	196,8 a	9,46	4,2	0
Teste F	0,33 NS	-	34,51 *	5,60 *	1,43 NS	1,00 NS	
C.V. (%)	12,4	0,0	3,9	1,7	5,1	7,7	
Temperatura 15° C							
Fotop. curto	1,53	100	4,5 a	181,2	9,1	4,0	0
Fotop. longo	1,47	100	5,2b	187,5	9,46	4,2	0
Teste F	0,25 NS	-	14,30*	0,82 NS	0,07 NS	0,86 NS	
C.V. (%)	26,4	0,0	13,4	4,9	5,4	13,8	
Temperatura 20° C							
Fotop. curto	2,07	100	6,12	240,6	10,88	4,20	0
Fotop. longo	1,93	100	6,38	254,0	10,72	3,80	0
Teste F	0,33 NS	0,0	1,76 NS	1,22 NS	0,16 NS	2,00 NS	
C.V. (%)	18,1	0,0	4,8	4,2	5,8	11,2	
Temperatura 25° C							
Fotop. curto	1,4	100	6,0	217,8	9,4	4,4	0
Fotop. longo	1,6	100	6,2	220,3	9,6	4,2	0
Teste F	0,28 NS	-	0,07 NS	0,11 NS	0,15 NS	2,34 NS	
C.V. (%)	0,69	0,0	1,08	0,22	0,07	1,7	

* Teste F significativo ($P \leq 0,05$); NS: Teste F não significativo ($P > 0,05$); Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade de erro.

Apesar dessa constatação, o resultado mais expressivo deste trabalho está relacionado com a diferenciação de gemas nas axilas de folhas, observada em 27,6% dos bulbos desenvolvidos sob temperatura

de 5°C, e em 53,5% dos bulbos desenvolvidos sob temperatura de 10°C, ambas promovidas sob regime de fotoperíodo curto (Tabela 6 e Figura 9). Esta resposta é demonstrada em vários trabalhos a campo, onde a exigência de frio teve maior importância do que o fotoperíodo na indução de gemas axilares, bem como no desenvolvimento do escapo floral em plantas de alho (Aoba & Takagi, 1971; Carvalho et al., 1980; Ferreira et al., 1986; Biasi & Mueller, 1999).

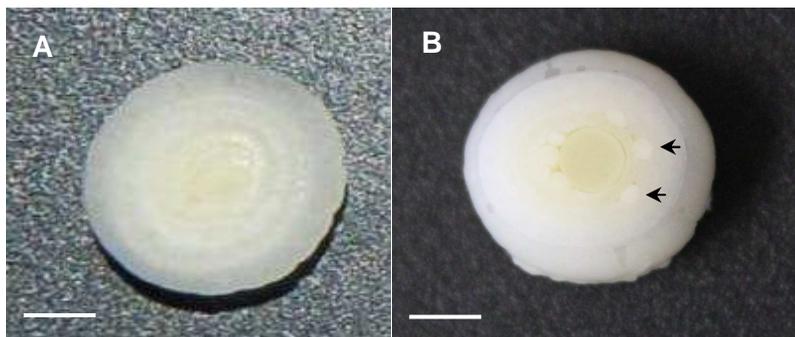


Figura 9. Secção transversal de microbulbos de alho da cultivar “Jonas” regenerados *in vitro*, não diferenciados (A), e diferenciados (B). Detalhes de gemas desenvolvidas nas axilas de folhas internas, indicadas por seta preta. Barras: 0,5cm. Caçador, SC, 2011.

É importante ressaltar que apesar do surgimento de gemas nos bulbos, não houve evolução das mesmas no decorrer do ciclo que permitisse a formação adequada do bulbo, ou seja, um bulbo composto por vários bulbilhos, semelhante à que ocorre em condição de cultivo no campo, conforme ilustrado na Figura 4 do Capítulo 1. Este fato porém, pode estar relacionado a alguns fatores como o envelhecimento precoce das plantas cultivadas *in vitro*, evidenciado pelo ciclo de crescimento curto e a escassez de nutrientes para manter o desenvolvimento do bulbo diferenciado, visto que há uma forte demanda na fase inicial do processo de bulbificação. Sendo assim, recomenda-se uma etapa adicional no sistema de micropropagação do alho, seja *in vitro* ou *ex vitro*, que favoreça a completa formação do bulbo.

4. Conclusões

A seleção do material vegetal é fundamental para a obtenção de explantes adequados à micropropagação, visto que, o êxito na introdução de plantas em cultivos *in vitro* é dependente da qualidade dos explantes utilizados. Neste trabalho, os bulbilhos de alho de tamanho grande, com massa entre 5 e 6g, demonstraram ser as melhores fontes para extração de meristemas caulinares para limpeza de viroses.

Entre os reguladores de crescimento de plantas avaliados no presente trabalho, o ANA foi mais efetivo, principalmente, para as variáveis relacionadas ao crescimento de bulbos *in vitro*. O ácido jasmônico e o ABA também apresentam potencial para induzir a formação de bulbos de alho *in vitro* como a auxina ANA. De modo geral, as concentrações elevadas dos reguladores de crescimento promovem efeito negativo na morfogênese *in vitro* de plantas de alho. O uso de BAP em combinação no meio de cultura na fase de bulbificação, promoveu a potencialização dos efeitos do ANA e AJ na variável número de bulbos por planta.

Os resultados deste trabalho apontam uma maior efetividade da sacarose na micropropagação do alho. Embora o número de bulbos por planta foi reduzido com o aumento da concentração de sacarose, a maioria das variáveis analisadas apresentaram ganhos com o aumento da concentração até o nível de 9%.

No que se refere aos efeitos climáticos na micropropagação do alho, sugere-se que plantas de alho cultivadas *in vitro* também apresentam respostas morfogenéticas para a indução e desenvolvimento de bulbos do tipo termo-fotoperiódico dependente. O tempo de exposição de plantas ao frio reduz a sensibilidade ao fotoperíodo para a indução da bulbificação. Da mesma forma, o tempo de vernalização dos bulbilhos doadores de meristemas influencia o valor da razão bulbar com maior intensidade sob fotoperíodo curto.

As variáveis de crescimento do alho responderam positivamente aos efeitos da redução da temperatura no ambiente de cultivo *in vitro*, especificamente as variáveis número de bulbo, porcentagem de bulbificação, diâmetro de bulbo e peso de bulbo, que apresentaram melhores respostas sob temperatura de 20°C. Contudo, a temperatura de 10°C e fotoperíodo curto de 11h/luz são condições ambientais favoráveis a indução de diferenciação e bulbificação em sistema de cultivo de alho *in vitro*.

5. Referências Bibliográficas

ALIZADEH, S. *In vitro* shoot culture and microtuber induction in steroid yam *Dioscorea composita* Hemsl. **Plant Cell, Tissue Organ Culture**, Dordrecht, v.53, p.107-112. 1998.

AL-ZAHIM, M. A.; FORD-LLOYD, B. V.; NEWBURY, H. J. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. **Plant Cell Reports**, v.18, p.473-477. 1999.

AOBA, T.; TAKAGI, H. Studies on bulb formation in garlic plants. III. The effects of cooling treatment of the seed bulb and of daylength during the growing period on bulb formation. **Journal of the Japanese Society of Horticultural Science**, Tokio, v.49, n.3 p.240-241. 1971.

ARGUELLO, J. A.; DE BOTTINI, G. A.; LUNA, R.; BOTTINI, R. Dormancy in Garlic (*Allium sativum* L.) cv. Rosado Paraguayo II. The Onset of the procecess during Plant Ontogeny. **Plant Cell Physiology**, v.27, n.3, p. 553-557. 1986.

ASCOUGH, G.D.; ERWIN, J.E.; VAN STADEN, J. *In vitro* storage organ formation on ornamental geophytes. **American Society Horticultural Science**, v.34, p.17-444. 2008.

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, p.487-491. 1992.

BARANDIARAN, X.; MARTIN, N.; RODRIGUEZ-CONDE, M.F.; Di PIETRO, A. Genetic variability in callus formation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.). **Plant Cell Reports**, v.18, p. 434-437. 1999.

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

BOCKISH, T.; SARANGA, Y.; ALTMAN, A. Garlic micropropagation by somatic embryogenesis. **Acta Horticulturae**, v.447, p.241-242. 1997.

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.

CALDAS, L.S.; HARIDASANI, P.; PEREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, A.J.A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas.** Brasília: Embrapa-CNPq; CBAB, 1998. v.1, p.87-132.

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.

CHEESMAN, L.; FINNIE, J.F.; VAN STADEN, J. *Eucomis zambesiaca* baker: Factors affecting in vitro bulblet induction. **South African Journal of Botany**, v.76, n.3, p. 543-549. 2010.

CHOW, Y.N.; SELBY, C.; HARVEY, B.M.R. Stimulation by sucrose of *Narcissus* bulbil formation in vitro. **The Journal of Horticultural Science and biotechnology**, v.67, p.289-293. 1992.

CONCI, V.C. Vírus y Fitoplasmas de ajo. In: Burba (Ed.) **50 temas sobre produccion de ajo – Ingenieria de cultivo.** v.3, p.267-291. 1997.

DABROWSKI, J.; DABSKI, M.; KOZAK, D. The influence of some growth regulators on regeneration of *lily* bulbs in vitro. **Acta Horticulturae**, v.325, p. 537-541. 1992.

ELLIS, D.M.; SKOGERBOE, C.G.; ANDREI, C.; HELLIER, B.; GAYLE, M. V. Cryopreservation of 12 *Allium sativum* (garlic) accessions: a comparison of plant vitrification solutions (pvs2) and pvs3. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v.7, p. 11-12. 2005.

FEREOL, L.; CHOVELON, V.; CAUSSE, S.; MICHAUX-FERRIERE, N.; KAHANE, R. Evidence of a somatic embryogenesis process for plant regeneration in garlic (*Allium sativum* L.). **Plant Cell Reports**, v.21, n.3, p.197-203. 2002.

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.

FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. de C. L.; CHU, E. P.; ALMEIDA, V. P. Tuberação In: Gilberto Barbante Kerbauy. (Org.). **Fisiologia Vegetal**, 1ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 409-420. 2004.

FILGUEIRA, F. A. R. Manual de Olericultura – **Culturas e comercialização de hortaliças**. 2^a ed. São Paulo, Agronômica Ceres, 1992. p. 105 – 142. 2v.

GANTAIT, S.; MANDAL, N. Tissue culture of *Anthurium andreaeanum*: A significant review and future prospective. **International Journal of Botany**, v.6, p. 207-219. 2010.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G. J. **Plant propagation by tissue culture**: volume 1. the background. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 2008.

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

HAUSER, B.; HORN, W. In vitro corm formation of *Sparaxis* hybrids. **Acta Horticulturae**, v.300, p.169–172. 1991.

HAVRANEK, P. Vírus-free clones obtained from meristem cultures. **Ochr. Rostl**, v.8, p.291. 1972.

HEMPEL, M. Application of growth regulators for in vitro propagation of ornamental plants. **Acta Horticulturae**, v.91, p. 247–260. 1979.

HOSOKI, T.; ASAHIRA, T. In vitro propagation of *Narcissus*. **HortScience**, v.15, p.602-603. 1980.

HUSSEY, G. In vitro propagation of *Narcissus*. **Annals of Botany**, v.49, p.707-719. 1982.

ILLG, R. D. Alho (*Allium sativum* L.): Produção de Microbulbilhos de alta qualidade. In: **Biofábricas: Produção industrial de plantas *in vitro*** (ed.) Lee Sheng Gerald, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Centro de Ciências Agrárias, Araras, SP., p. 52-61. 1995.

IVANOVA, M.; NOVÁK, O.; STRAND, M.; VAN STADEN, J. Endogenous cytokinins in shoots of *Aloe polyphylla* cultured *in vitro* in relation to hyperhydricity, exogenous cytokinins and gelling agents. **Plant Growth Regulation**, v. 50, p. 219-230. 2006.

KELLER, E. R. J. Sucrose, cytokinin, and ethylene influence formation of *in vitro* bulblets in onion and leek. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.40, p. 113-120. 1993.

KENEL, F.; EADY.; BRINCH, S. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and regeneration of garlic (*Allium sativum*) immature leaf tissue. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.29, p. 223-230. 2010.

KERBAUY, G.B. Competência e determinação celular em cultura de células e tecidos de plantas. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S. e BUSO, J.A. (Eds.). **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, Parte II, v.2, p.519 531. 1999.

KERBAUY, G.B. **Micropropagação comercial e os percalços rotineiros da estabilidade genética**. In: V Congresso Brasileiro de cultura de tecidos de plantas. 2011, Joinville, SC.

KIM, K.; DAVELAAR, E.; DE KLERK, G. Abscisic acid controls dormancy development and bulb formation in lily plantlets regenerated *in vitro*. **Physiologia Plantarum**, v.90, p.59-64. 1994.

KIM, Y.J.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. In vitro propagation of *Hyacinthus*. **Horticultural Science**, v.6, p.645-647. 1981.

KNOFEL, H.D.; BRUCNER, C.; KRAMELL, R.; SEMBDNER, G.; SCHREIBER, K. Radioimunoassay for the natural plant growth regulator jasmonic acid. **Biochem. Physiology Pflazen**, v.186, p. 387-394. 1990.

KODA, Y. The role of jasmonic acid and related compounds in the regulation of plant development. **International Review of Cytology**, v.133, p.133-199. 1992.

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

MAKOWSKA, Z.; KEKKER, J.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of apices isolated from garlic (*Allium sativum* L.) bulbils and cloves. **Cryo-Letters**, v. 20, 3ed, p.175-183. 1999.

MANN, L. K. Anatomy of the garlic bulb and factors affecting bulb development. **Hilgardia**, Berkeley, v.21, n.8, p.195-249. 1952.

MATSUBARA, S.; CHEN, D. In vitro production of garlic plants and field acclimatization. **HortScience**, v.24, n.4, p.677-679. 1989.

MEDINA, R. D.; FLACHSLAND, E. A.; GONZALEZ, A. M.; TERADA, G. In vitro tuberization and plant regeneration from multimodal segment culture of *Habenaria bractescens* Lindl., an Argentinean wetland orchid. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.97, p.91-101. 2009.

MENEZES SOBRINHO, J.A. **Cultivo do alho** (*Allium sativum* L.). 3. ed. Brasília: EMBRAPA/CNPQ, 1997. 16 p. (Instruções Técnicas, 2).

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**, v.6, p.243-247. 1994.

MORICONI, D.N.; CONCI, V.C.; NOME, S.F. Rapid multiplication of garlic (*Allium sativum* L.) *in vitro*. **Phyton**, v. 51, p. 145-151. 1990.

MUELLER, S.; VIEIRA, R. L.; BIASI, J. Efeito da limpeza de vírus sobre a produtividade de alho em Caçador, SC. **Agropecuária Catarinense**, v.18, p.50-52. 2005.

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

MYERS, J. M.; SIMON, P. W. Regeneration of garlic callus as affected by clonal variation, plant growth regulators and culture conditions over time. **Plant Cell Reports**, v.19, n.1, p.32-36. 1999.

MYERS, J.M.; SIMON, P.W. Continuous callus production and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) using root segments from shoot tip-derived plantlets. **Plant Cell Reports**, v. 17, p. 726-730. 1998.

NAGAKUBO, T.; NAGASAWA, A.; OHKAWA, H. Micropropagation of garlic through *in vitro* bulblet formation. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.2, p.175-183. 1993.

NHUT, D.T. TEIXEIRA DA SILVA, J.A.; HUYEN, P.X.; PAEK, K.Y. The importance of explant source on regeneration and micropropagation of *Gladiolus* by liquid shake culture. **Sci Horti** (Amsterdam) v.102, p.407-414. 2004.

NIWATA, E. Cryopreservation of *Allium*. **Cryo-Letters**, v.16, p.102-107. 1995.

NOJIRI, H.; YAMANE, H.; SETO, H. Qualitative and quantitative analysis of endogenous jasmonic acid in bulbing and non-bulbing onion plants. **Plant Cell Physiol.**, v.33, p.1225-1231. 1992.

NOVAK, F.J. *Allium* tissue culture. In: **Onions and allied crops**, Rabinowitch, H.D. and Brewster, J.L. (Eds). Vol. 1, CRC Press Inc., Florida, USA, p. 234-250. 1990.

PARMESSUR, Y.; ALJANABI, S.; SAUNTALLY, S.; DOOKUNSAUNTALLY, A. Sugarcane yellow leaf virus and yellows phytoplasma: elimination by tissue culture. **Plant Pathology**, Oxford, v.51, p.561-566. 2002.

PARTHIER, B.; BRUCKNER, C.; DATHE, W.; HAUSE, B.; HERMANN, G.; KNOFEL, H.D.; KRAMEL, H.M.; LEHMANN, J.; MIERSCH, O.; REIMBOTHE, St.; SEMBDNER, G.; WASTERACK,

C.; NIEDEN, U.Z. **Jasmonates: metabolism, biological activities, and modes of action in senescence and stress responses.** In: Progress in Plant Growth regulation (Karssen, C.M; Van Loon, L.C. & Vreghdenhil, D. eds) Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p. 276-285. 1992.

PIERIK, R.L.M., STEEGMANS, H.H.M. Effect of auxins, cytokinins, gibberellins, abscisic acid and ethephon on regeneration and growth of bulblets on excised bulb scale segments of *Hyacinth*. **Physiologia Plantarum**, v.34, p.14–17. 1975.

PILET, P.E.; BARLOW, P.W. The role of abscisic acid in root growth and gravireaction: A critical review. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v.6, p.217-265, 1987.

RADMANN, E. B.; GONCALVES, E. D.; FORTES, G. R. de L. Concentrações de ácido indolbutírico e períodos de escuro, no enraizamento "in vitro" de amoreira-preta (*Rubus* sp.), cv. Ébano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 1, p. 124-126. 2003.

RAVNIKAR, M; ZEL, J; PLAPER, I; SPACAPAN, A. Jasmonic acid stimulates shoots and bulb formation of garlic *in vitro*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.12, p. 73-77, 1993. 1993.

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

SANTOS, J.; SANTOS, I.; SALEMA, R. In vitro production of bulbs of *Narcissus bulbocodium* flowering in the first season of growth. **Scientia Horticulturae**, v.76, p.205-217. 1998.

SANTOS, N.; SALEMA, R. Promotion by jasmonic acid of bulb formation in shoot cultures of *Narcissus triandrus* L. **Plant Growth Regulation**, v.30, p.133–138. 2000.

SATO, A. Y.; SEDIYAMA, T.; BORÉM. A.; CECON, P. R.; JUNQUEIR, C. S. Influência do ácido abscísico na micropropagação da cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Acta Scientiarum Maringá**, v. 23, n. 5, p. 1235-1237. 2001.

SEABROOK, J.E.A. *Narcissus* (Daffodil). In: **Handbook of Plant Cell Culture**, V. 5 (24). Ornamental Species. (AMMIRATO, P.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R; BAJAJ, P.S., Eds). McGraw-Hill Publishing Company, New York, p.577-97. 1990.

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

SILVA, J. L. O. da. **Análise do crescimento de alho (*Allium sativum* L.) cultivar Chonan, sob três períodos de frigidificação pré-plantio dos bulbos**. Lavras, 1982. 76 p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Lavras.

SLABBERT, M.M; NIEDERWIESER, J.G. *In vitro* bulblet production in *Lachenalia*. **Plant Cell Reports**, v.18, p. 620-624. 1999.

SMEEKENS, S. Sugar-induced signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.51, p.49–81. 2000.

SQUIRES, W.M.; LANGTON, F.A.; FENLON, J.S. Factors influencing transplantation success of micropropagated *Narcissus* bulblets. **Journal of Horticultural Science**, v.66, p.661-671. 1991.

STAIKIDOU, L.; WATSON, S.; HARVEY, B.M.R. SELBY, C. *Narcissus* bulblet formation in vitro: effects of carbohydrate type and osmolarity of the culture medium. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.80, p.313–320. 2005.

TESFAY, S. Z. I.; BERTLING, A. O.; ODINDO, P. L.; WORKNEH, T.S. Growth responses of tropical onion cultivars to photoperiod and temperature based on growing degree days. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.71, p.5875-15882. 2011.

TORRES, A.C.; FAJARDO, T.V.M.; DUSI, A.N.; RESENDE, R.O.; BUSO, J.A. Shoot tip culture and thermotherapy for recovering virus-free plants of garlic. **Horticultura Brasileira**: Brasília, DF, v. 18, n.3, p.192-195. 2000.

TORRES, A.C.; TEIXEIRA, S. L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA – CNPH, CBAB, 1998. v.1 p.133-145.

WARD, L.I. A survey of viral diseases of *Allium* crops in New Zealand. **Australasian plant pathology APP**, v. 38, n.5, p. 533-539. 2009.

XU, Z.; UM, Y.; KIM, C.; LU, G.; GUO, De-PING; LIU, H.; BAH, A. A.; MAO, A. Effect of plant growth regulators, temperature and sucrose on shoot proliferation from the stem disc of Chinese jiaotou (*Allium chinense*) and in vitro bulblet formation. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.30, p.521–528. 2008.

YAMAGISHI, M. Effects of culture temperature on the enlargement, sugar uptake, starch accumulation, and respiration of in vitro bulblets of *Lilium japonicum* Thunb. **Scientia Horticulturae**, v.73, p.239–247. 1998.

YAMAGUCHI, T.; STREET, H.E. Stimulation of the growth of excised cultured roots of soybean by abscisic acid. **Annals of Botany**, Elmont, v.41, n.17, p.1129-1133. 1977.

YAMAZAKI, H.; NISHIJIMA, T.; YAMATO, Y.; MIURA, H. Involvement of abscisic acid (ABA) in bulb dormancy of *Allium wakegi* Araki I. Endogenous levels of ABA in relation to bulb dormancy and effects of exogenous ABA and fluridone. **Plant Growth Regulation**, v.29, p. 189–194. 1999.

YI, Y.B.; LEE, K.S.; CHUNG, C.H. Protein variation and efficient in vitro culture of scale segments from *Hyacinthus orientalis* L. cv. Carnegie. **Scientia Horticulturae**, v.92, p.367–374. 2002.

YURI, J. E. MOTA, J. H.; SOUZA, R. J.; RESENDE, M.; PASQUAL, M. Vernalização do alho para cultivo *in vitro*. **Horticultura Brasileira**: Brasília, v.17, n.2, p.118-124. 2005.

ZDRAVKOVIC-KORAC, S.; MILOJEVIC, J.; CALIC-DRAGOSAVAC, D.; MITIC, N.; VINTERHALTER, B. Somatic

embryogenesis and plant regeneration from root sections of *Allium schoenoprasum* L. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.101, n.2, p.237-244. 2010.

ZEL, J.; DEBELJA, K.; UCMAN, N. R.; RAVNIKAR, M. 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**, v.33, p. 231-235. 1997.

ZING, F. W. Rate of growth and nutrient absorption of late garlic. **Proceedings of the American Society Horticultural Science**, California, v.83, p.579-584. 1963.

CAPÍTULO III

ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS ENDÓGENOS DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS E ÁCIDO ABSCÍSSICO EM PLANTAS DE ALHO E RESPOSTAS NO PROCESSO DE BULBIFICAÇÃO.

1. Introdução

A bulbificação, em termos gerais, indica o intumescimento na base de bainhas foliares de algumas espécies de planta e sua taxa pode ser determinada pela relação entre o diâmetro do pseudo-caule pelo diâmetro maior da base da planta (Burba, 1983). Em plantas de alho, isto não é necessariamente uma evidência definitiva do início da transformação de gemas em bulbilhos, desencadeado pela diferenciação de células meristemáticas localizadas nas axilas de folhas jovens. Este fenômeno em alho é tido como termo-fotoperiódico dependente (Menezes Sobrinho, 1997), conforme relatado também para outras espécies que produzem órgãos de reserva (Mauk & Langille, 1978; Racca et al., 1989; Rodrigues, 1994).

Como proposto por Ferreira et al. (1986), a bulbificação do alho ocorre em resposta à interação entre fotoperíodo e vernalização, sendo que o efeito de cada fator ambiental varia entre genótipos. Por exemplo, em cultivares nobres, a vernalização pode reduzir a sensibilidade ao fotoperíodo em função do período de exposição das plantas ao frio (Menezes Sobrinho, 1997; Biasi & Mueller, 1999). Esta resposta foi demonstrada em vários trabalhos, onde a exigência de frio teve maior importância do que o fotoperíodo na indução de gemas axilares, bem como no desenvolvimento do escape floral em plantas de alho (Mann, 1952; Aoba & Takagi, 1971; Carvalho et al., 1980; Ferreira et al., 1986; Biasi & Mueller, 1999).

Muitas alterações bioquímicas também ocorrem durante a formação e o crescimento de órgãos de reservas em plantas, incluindo conteúdo de água, concentração de compostos aromáticos, ácidos orgânicos, esqueletos de carbono, minerais, compostos voláteis e hormônios do crescimento (Mohamed-Yasseen et al., 1994). Durante o processo de bulbificação em plantas de cebola, carboidratos armazenados no pseudocaule são translocados para o interior do bulbo, na base das bainhas mais internas, enquanto as bainhas foliares

periféricas tornam-se mais finas, formando uma camada de proteção do bulbo (Hussey & Falavigna, 1980). De acordo com Tsafack et al. (2009), o acúmulo adequado de reservas, como carboidratos solúveis, amido e proteínas, influencia de forma decisiva o desenvolvimento de bulbos de *N. triandrus* L., sendo crucial para a retomada do desenvolvimento após o período de armazenagem dos bulbos.

Devido às múltiplas funções que os açúcares desempenham nas células, o metabolismo dos carboidratos solúveis representa um dos mais importantes processos no ciclo celular (Carrier et al. 1999). Em muitas espécies que produzem órgãos de reserva, em particular nas bulbosas, esses compostos parecem agir na proteção das células durante o inverno, substituindo a água na manutenção de estruturas hidrofílicas, evitando a formação de cristais intra e intercelulares (Wang & Valkonen, 2008), sendo importantes também na formação de embriões, atuando como sinalizadores do processo morfo genético (Verma & Dougall, 1977; Lou et al. 1996).

A literatura relata que além da influência de fatores do ambiente e do acúmulo de carboidratos, uma mudança gradual na composição relativa de reguladores de crescimento ocorre durante o processo de formação de órgãos de reserva em plantas de várias espécies, como a concentrações de inibidores e promotores de crescimento (Thomas & Isenberg, 1972; Mauk & Langille, 1978; Arguello et al., 1986; Mohamed-Yasseen et al., 1994. Longo, 2009).

Existe um consenso entre pesquisadores de que o processo de tuberização da batata (*S. tuberosum*) é controlado por fatores do ambiente, principalmente fotoperíodo e temperatura, que regulam os níveis endógenos de substâncias de crescimento (Slater, 1968; Ascough et al., 2008; Sarkar, 2008). Lang (1987), questiona se estes fatores ambientais poderiam produzir uma bateria de hormônios diferentes, cada um para uma resposta morfo genética em particular.

Não obstante, Mauk & Langille (1978), já haviam observado que a atividade total da citocinina ZR foi significativamente maior em plantas induzidas à tuberização (por manipulação do fotoperíodo) em relação as plantas não induzidas. Trabalhos anteriores à estes, ainda reportam que dois de quatro compostos citocinina, separados a partir de tecidos de batata, foram significativamente maiores em plantas sob condições indutivas, com início da tuberização observado após 8 a 10 dias sob tais condições (Forsline & Langille, 1975 e 1976). Estes resultados, segundo os autores, suportam o papel de citocininas como causal no processo de tuberização.

Como relatado no Capítulo 1, morfológicamente, a primeira etapa do processo de bulbificação em alho consiste na diferenciação de células meristemáticas em gemas das axilas de folhas jovens, e subsequente transformação dessas gemas em bulbilhos (Shah & Kothari, 1973). Contudo, o evento da diferenciação, induzido pelo frio (Mann 1952; Shah & Kothari 1973 e Arguello, 1986) pode também estar relacionado com mudanças de balanços hormonais endógenos que resultam em uma mudança de rota dos meristemas de desenvolvimento de folhas expandidas para folhas de reserva (bulbilhos), onde serão acumulados os fotoassimilados produzidos pela planta (Arguello, 1983 e 1986).

O Ácido Abscísico (ABA) tem sido divulgado como uma substância envolvida na formação de órgãos de reserva em algumas espécies cultivadas *in vitro*, observado em *D. bulbifera* (Ammirato, 1982), em *A. cepa* (Matsubara & Kimura, 1991), em *I. batatas* (Jean & Cappadocia, 1992), em *M. esculenta* (Sato et al., 2001) e em plantas de *Lillium spp.* (Xu et al., 2006).

O ABA é sintetizado a partir de um intermediário da biossíntese de xantofilas (Taiz & Zeiger, 2004), sendo iniciado em cloroplastos ou amiloplastos de tecidos fotossintetizantes ou em outros plastídios, no caso de tecidos que não fotossintetizam (Matsubara & Kimura, 1991). Sua concentração na planta depende do nível de degradação, conjugação, compartimentação e transporte (Kende & Zeevaart, 1997). Dentro da planta, o ABA tem sido detectado em todos os órgãos e tecidos vivos, desde a coifa da raiz até a gema apical da parte aérea. Matsubara e Kimura (1991) constataram acúmulo de ABA endógeno em todos os tecidos de plantas de cebola durante crescimento *in vitro* e no período de pré-colheita.

De acordo com Taiz & Zeiger (2004), o ABA é um regulador de crescimento de plantas que pode também estar envolvido no controle de outros processos fisiológicos, tais como a abertura de estômatos, a síntese de proteínas de estoque de sementes, e a tolerância ao déficit de água. Estes autores afirmam ainda que, enquanto algumas dessas respostas ao ABA podem ser rápidas, em questão de minutos, como é o caso do fechamento de estômatos, outras podem ser mais demoradas e são conhecidas por requererem mudanças na expressão gênica. Em adição, o ABA influencia muitos aspectos do desenvolvimento da planta atuando como antagonista de auxinas, citocininas e giberelinas. Entretanto, muitos autores ainda reconhecem que, dos mecanismos de percepção de sinal hormonal, a rota de transdução desse composto ainda permanece obscura em muitos aspectos (Xu et al., 2006).

Foi demonstrado que mudanças na concentração de certas substâncias durante a fase de bulbificação do alho ocorrem de fato, como em carboidratos solúveis e reguladores do crescimento (Burba, 1983; Arguello et al., 1986; Pooler & Simon, 1993). Porém, até o presente, não foi encontrado nenhum estudo realizado para caracterizar a sinalização hormonal e/ou bioquímica da transição ao bulbo de *A. sativum*, tanto em resposta à ontogenia quanto a de fatores ambientais, como já reportado para outras espécies do gênero, como em *A. wakegi* (Yamazaki et al., 1999) e em *L. rubellum* (Xu et al., 2006).

Arguello et al. (1983 e 1986), autores encontrados na literatura abordando esse contexto em plantas de alho, observaram um baixo nível de giberilinas e uma forte atividade de inibidores (ABA e derivados) coincidindo com o momento da diminuição da razão bulbar em plantas da cultivar “Rosado Paraguai”. O início da diminuição da razão bulbar e uma suposta alteração dos níveis endógenos de substâncias foi hipotetizado por Shah & Kothari (1973) como sendo o momento em que gemas diferenciadas a partir de células meristemáticas situadas nas axilas de folhas jovens de alho seriam induzidas à formação de bulbilhos.

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 *in vitro* das mesmas, e subsequente bulbificação, também *in vitro*, por meio de formação de estruturas de reserva na base. Desse modo, a microbulbificação *in vitro* constitui um avanço tecnológico muito importante na micropropagação do alho, além de ser bastante útil em programas de intercâmbio de germoplasma.

Entretanto, nos sistemas *in vitro*, a micropropagação desta espécie com foco na limpeza de vírus, tem sido limitada devido à qualidade e ao reduzido número de microbulbos produzidos por planta. Até o presente, não há informação suficiente da pesquisa que dê suporte para o desenvolvimento de um protocolo eficientemente capaz de induzir a diferenciação de gemas e, conseqüentemente, a formação de um bulbo morfológicamente completo, como ocorre em plantas cultivadas a campo, o quê, do ponto de vista de rendimento, tornaria o sistema mais viável. Para tanto, estudos bioquímicos para evidenciar o envolvimento de substâncias como carboidratos solúveis e reguladores de crescimento no processo de bulbificação do alho são necessários como estratégia

para esclarecer esse evento fisiológico e para utilizar essas informações para adequação de protocolos de micropropagação de alho.

Nesse sentido, o presente trabalho objetivou determinar a relação entre as mudanças temporais dos níveis endógenos de carboidratos solúveis e do ABA em plantas de alho cultivadas *in vitro*, para determinar o possível papel dessas substâncias no processo de bulbificação e, se possível, identificar um marcador para prever o surgimento do início deste processo.

2. Material e Métodos

As análises de carboidratos solúveis foram realizadas no Laboratório de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As análises de ABA Abscísico foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo (USP). Os métodos aqui aplicadas foram baseadas nos trabalhos de Manozzo Galante (2008), para as análises de carboidratos e de Peres et al. (1997), para as análises de ABA. As análises destas duas substâncias também foram realizadas em plantas cultivadas no campo com vistas a contribuir para melhor compreensão dos resultados obtidos nas análises de amostras de plantas regeneradas *in vitro*.

2.1. Condições de cultivo das plantas amostradas

2.1.1. *In vivo*

Plantas de alho da cultivar “Jonas”, foram cultivadas na área experimental do Setor de Olericultura da Epagri/Estação Experimental de Caçador, (Caçador/SC), em um solo classificado como Latossolo Bruno distrófico típico (Embrapa, 1999) e apresentava os seguintes atributos: pH (água)= 6,1; P= 3,6 mg L⁻¹; K= 210 mg L⁻¹; MO= 45 mg L⁻¹; Al= 0,0 cmolc L⁻¹; Ca= 9,6 cmolc L⁻¹; Mg= 4,6 cmolc L⁻¹; V= 75 %. O preparo do solo para o plantio constou de aração, gradagem e levantamento de canteiros a 0,20 m de altura x 1,0 m de largura, e as parcelas foram formadas por seis fileiras de plantas, espaçadas 0,20 m entre linhas e 0,10 m entre plantas. As amostragens foram feitas apenas das plantas das quatro fileiras centrais, sendo consideradas bordaduras as duas fileiras laterais e as plantas das cabeceiras das quatro fileiras centrais. As adubações do solo foram feitas de acordo com a análise do

solo, sendo as recomendações para o cultivo tradicional. As práticas de solo, tratos culturais e fitossanitários foram realizados de acordo com as recomendações técnicas preconizadas para a cultura na região. O plantio foi realizado na primeira quinzena de julho de 2010.

2.1.2. *In vitro*

Foram coletadas amostras provenientes do Experimento 5, Capítulo 2, cultivadas sob as seguintes condições ambientais: sob temperatura de 10°C e fotoperíodos curto (11h/luz) e longo (16h/luz), e sob temperatura de 25°C e fotoperíodo longo (16h/luz).

2.2. Coleta e armazenagem de amostras para análises de carboidratos e Ácido Abscísico (ABA).

Amostras de cultivo *in vivo* – quatro amostras (1 grama cada) foram coletadas da parte aérea e da base das plantas. As amostras foram coletadas de duas maneiras. Na primeira, amostras da parte aérea (na região mediana das três últimas folhas expandidas) e da base da planta (bulbo inteiro) foram coletadas aos zero, 30 e 60, 90, 120 e 160 dias após o plantio. Na segunda, as amostragens foram realizadas apenas na base das plantas, coletando-se a base das bainhas da 2^a, 3^a e 5^a folha, incluindo gemas desenvolvidas, quando presente, aos 60, 70, 80, 90 e 120 dias após o plantio. Três das amostras vegetais coletadas foram utilizadas para extração e análises de carboidratos e ABA, e a quarta amostra foi armazenada separadamente para eventual comprovação de resultados.

Amostras de cultivo *in vitro* - três amostras foram coletadas da parte aérea (folhas) e na base (região do bulbo) de plantas. As coletas foram realizadas aos zero, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 e 70 dias, a partir da transferência das plantas para o meio de bulbificação. Imediatamente após a coleta, as amostras foram lavadas até a completa remoção do meio de cultura aderido aos tecidos. A quantidade amostrada foi de acordo com a disponibilidade de material vegetal (500 a 1000mg de MF).

As amostras destinadas às análises de carboidratos foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -20 °C, imediatamente após as coletas. As amostras destinadas às análises de ABA foram congeladas em nitrogênio líquido, liofilizadas e mantidas em ultra-freezer (-80°C) até o momento do uso. Para ambas as análises,

as amostras foram coletadas sempre no mesmo horário do dia, as 9 horas, no campo e *in vitro*. Na Figura 1 estão indicadas as regiões de coleta de amostras cultivadas *in vivo* e *in vitro*.

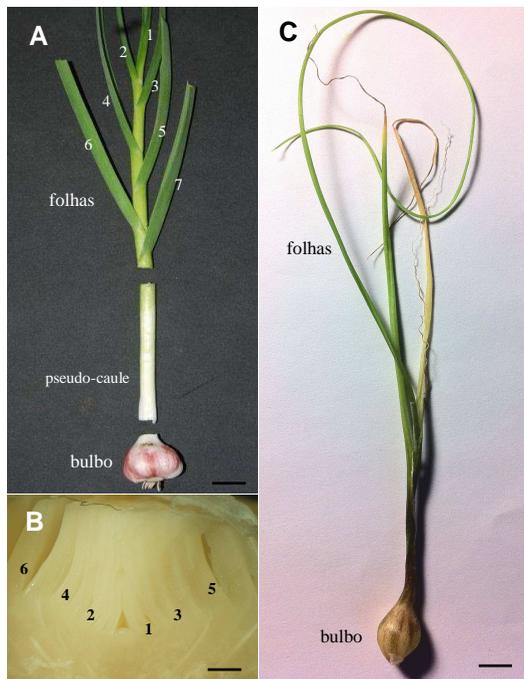


Figura 1. Regiões das plantas amostradas para análises de carboidratos e ABA. **A:** Planta de alho cultivada a campo (*in vivo*) aos 140 dias após o plantio com detalhes do bulbo, pseudo-caule (formado pelas bainhas foliares), e parte aérea (folhas). As coletas na parte aérea da planta foram feitas nas folhas numeradas de 1 a 4. **B:** Secção longitudinal da base da planta de alho aos 60 dias após o plantio no campo. Os números de 1 a 6 correspondem as bases das bainhas das folhas amostradas, da mais nova (1) para a mais velha (6). **C** - Regiões amostradas da planta de alho cultivada *in vitro*. Barras: 0,5 cm (B,C); 5 cm (A). Caçador, SC, 2011.

2.3. Extração e quantificação de carboidratos solúveis

As medidas de concentração dos carboidratos nas amostras coletadas de ambos os cultivos foram efetuadas em triplicata, conforme procedimentos descritos abaixo. Os métodos colorimétricos empregados envolvem a técnica de espectrometria na faixa do visível utilizando-se espectrofotômetro (Thermo Spectronic® modelo Genesys 2).

As amostras foram descongeladas, homogeneizadas em almôbariz, e submetidas à tripla extração em etanol 80% a 80°C por 10 min, seguida de centrifugação a 12.000g por 15 minutos em centrífuga modelo 5415C (Eppendorf, New York), e filtrada a vácuo em tecido de algodão. Da combinação dos três extratos alcoólicos foi obtida a fração correspondente aos açúcares solúveis. O resíduo foi armazenado a -20°C para posterior extração de amido. Os extratos etanólicos foram concentrados em rotaevaporador a 37 °C até um pequeno volume e retomados em 5 mL de água destilada para as análises colorimétricas. Os sobrenadantes foram diluídos seis vezes para as análises de carboidratos solúveis totais.

O teor de açúcares totais foi determinado colorimetricamente pelo método de fenol-sulfúrico conforme descrito por Dubois et al. (1956). Este método baseia-se no princípio de que açúcares simples, oligossacarídeos, polissacarídeos e seus derivados formam uma cor amarela-alaranjada estável quando tratados com fenol e ácido sulfúrico concentrado.

Em um tubo de ensaio foram adicionados 500µl de amostra (previamente diluída), 500µl de fenol 5% e 2,5 ml de ácido sulfúrico, em seguida agitados, incubados a temperatura ambiente por 30 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm, e comparadas a uma curva padrão de feita a partir de uma solução de D-glucose (Sigma) (100 µg mL⁻¹). A quantificação de açúcares totais foi realizada utilizando-se a equação da reta obtida a partir da curva padrão construída, sendo expresso em mg g⁻¹ MF (massa fresca).

2.4. Extração e quantificação de ácido abscísico (ABA)

Preparo das amostras, purificação e fracionamento dos extratos - Cada uma das amostras (dos cultivos *in vivo* e *in vitro*) foram maceradas com nitrogênio líquido em almôbariz com 3 mL de metanol (MeOH) 80% e butil-hidroxi-tolueno (BHT) 0,18 mM e em seguida agitadas durante 60 horas, no escuro a 4°C. Durante a maceração, adicionaram-se

em cada amostra 100 μL de uma solução estoque, contendo 0,5 μCi de $\text{cis,trans}(\pm)^3\text{H-ABA}$ para o cálculo do rendimento de extração. Cada extrato foi então passado em filtros de nitrocelulose de 0,45 μm , 0,22 μm e em cartucho “sep-pak” C-18 (Waters[®]), para eliminação de pigmentos clorofilados e lipídios. O eluído metanólico foi totalmente reduzido a sua fase aquosa, em evaporador a vácuo (speed-vac) a -110°C, ao qual adicionou-se 230 μL de água ácida (água + ácido fórmico, pH 3,0), estando, assim, prontas as amostras para serem injetadas num aparelho de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), contendo uma coluna preparativa (Nova-Pak[®] C18, 4 μm , 3,9 x 150 mm).

O solvente de eluição (solvente “A” e “C”) constituiu-se de uma mistura de ácido fórmico (0,2%) e metanol, em proporção variável com o decorrer do tempo de fracionamento. As amostras foram então injetadas em HPLC, sendo as frações coletadas em tubos plásticos de centrifugação (1,5 ml) num intervalo entre 19 e 21 minutos, mesmo período de retenção do ABA padrão, como indicado no cromatograma da Figura 2.

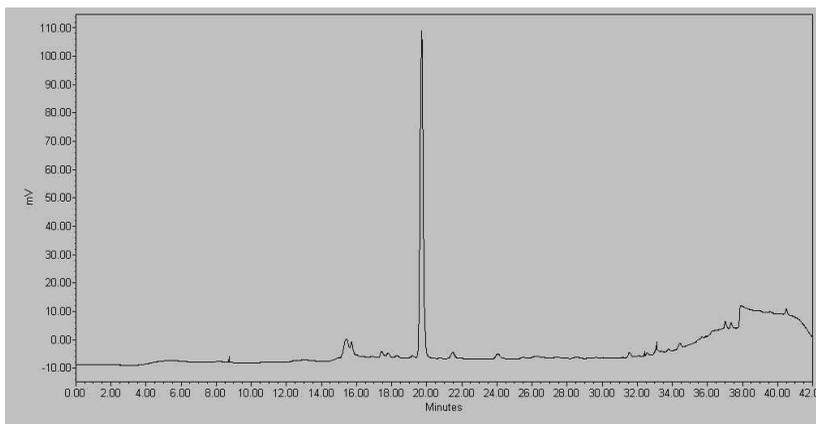


Figura 2. Cromatograma do ABA padrão (+) cis/trans ABA injetado em HPLC indicando o intervalo de coletas das frações das amostras. São Paulo, SP, 2011.

Após separação em HPLC, procedeu-se a secagem das frações coletadas em evaporador, sendo, em seguida, metiladas pela adição de 250 μl de uma solução etérea de diazometano. A metilação foi

recomendada como uma forma de intensificar o reconhecimento do hormônio pelo anticorpo específico. Após a completa evaporação, as amostras foram retomadas em 800 µl de água ultrapurificada, as quais foram utilizadas nas dosagens em ELISA e no cálculo do rendimento de extração. Para o cálculo do rendimento de extração, alíquotas de 100 µl de cada fração foram retiradas para contagem radioativa, utilizando-se um espectômetro de cintilação líquida.

A amostra de hormônio padrão ABA (Sigma[®], Cat. No. A4906), foi injetada no cromatógrafo, separadamente das amostras vegetais, a fim de se conhecer o tempo de retenção característico desse hormônio. Esse dado é de extrema importância para comparar com aqueles obtidos com os extratos vegetais e, assim, procedermos à escolha das frações a serem analisadas pelo teste imunoenzimático de dosagem hormonal.

2.5. Dosagem do teor de ABA através do teste imunoenzimático-ELISA

O Imunoensaio enzimático-ELISA se baseia no estabelecimento de um equilíbrio entre antígeno (Ag) e anticorpo (Ac) correspondente e são testes convenientes para determinação quantitativa de hormônios vegetais. Esse método de dosagem tem como princípio a competição entre duas formas de um mesmo antígeno (hormônio vegetal): a forma livre (AgL) presente no extrato (amostra vegetal) e a forma fixa (Agf) aderida a um suporte sólido, por uma quantidade limitada de anticorpos.

O método ELISA é baseado na quantificação, por uma técnica de revelação enzimática, do termo Agf-Ac, após a eliminação por lavagem dos outros termos (Ac, AgL e AgL-Ac) da reação. Por referência a uma curva padrão, determina-se a quantidade de hormônio presente no extrato vegetal. O método imunoenzimático empregado neste trabalho foi desenvolvido por vários pesquisadores, encontrando-se descrito nos artigos de Maldiney et al. (1986); Sotta et al. (1987); Peres et al. (1997) e Yamazaki et al. (1999).

Após a passagem no aparelho de HPLC as amostras coletadas foram quantificadas por meio de imunoensaio enzimático, utilizando o kit Phytodetek[®] (Agdia – n^o de catálogo na Sigma PDK 09347/0096), seguindo as instruções do fabricante, conforme descritas a seguir:

Foram utilizadas placas de poliestireno transparentes, sensibilizada com anti-corpo (Agf), contendo 96 orifícios (8 fileira de 12 orifícios). As duas colunas exteriores foram reservadas ao hormônio padrão visando à obtenção dos resultados necessários à construção de

uma curva padrão para ABA, e para medidas de controle, isto é, ausência de antígeno e ausência de anticorpos. A dosagem dos teores de hormônio do extrato (amostra vegetal) foi efetuada nos 80 orifícios centrais, conforme esquema da Figura 3.

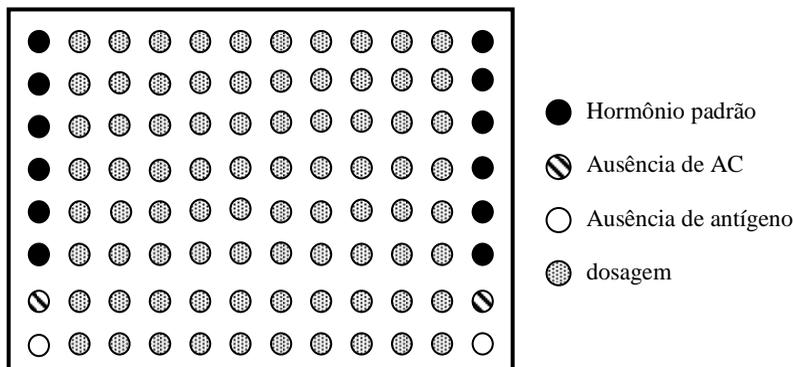


Figura 3- Esquema representativo de dosagem de ABA pelo teste imunoenzimático-ELISA.

Competição: foram adicionados 100 μ L de antígeno livre (AgL) por orifício, sendo esse antígeno constituído ora pelo hormônio referência da curva padrão (oito diluições de 0 a 1000 pmoles ABA/mL), ora pelo extrato vegetal (amostra). A competição começou quando foram acrescentados 100 μ L por orifício de um segundo anticorpo (Ac2) conjugado com fosfatase alcalina (ABA-tracer), diluído em tampão TBS (descrição no Kit). Após leve agitação, as placas foram cobertas com filme de PVC e incubadas no escuro a 4 °C durante 3 horas.

Após o período de incubação, o conteúdo das placas foi removido na pia, através de movimentos rápidos e em seguida lavadas 3 vezes com 200 μ L por orifício de uma solução de lavagem (descrição no kit).

Revelação: Após lavagem e secagem das placas, foram depositados 200 μ L por orifício de solução de revelação PNP diluído em tampão. Logo em seguida, as placas foram incubadas por 60 minutos a 37°C. Na sequência, o conteúdo das placas foi removido, antes da leitura das densidades ópticas (DO) a 405 nm em leitora de placas.

A intensidade da cor é relacionada com a concentração de ABA da amostra por meio de uma curva padrão. O teste para Ácido Abscísico utiliza um anticorpo monoclonal anti-ABA e é sensível na faixa de

0,032 a 0,16 picomoles de ABA/mL. Por meio das DO obtidas calcularam-se as DO relativas pela expressão:

$B/B_0 = (B - D)/(B_0 - I)$ $B/B_0 = DO$ relativa;

B = DO na fração dosada;

I = DO inespecífica lida em excesso de AgL (100 pmoles) corresponde a curva padrão no orifício com 100 pmoles de ABA (maior concentração de ABA);

B_0 = DO correspondente à ausência de AgL valor da DO no ponto da curva padrão onde não foi adicionado ABA (menor concentração de ABA, 0 pmoles).

As curvas padrão foram elaboradas com base no Log dos valores de absorbância e concentração em pmol do padrão. Montou-se uma planilha eletrônica em Microsoft Excel^{MR} para os cálculos de dosagem. Estes levaram em conta 4 parâmetros: 1) os valores obtidos nas dosagens (comparação com a curva padrão); 2) o rendimento da purificação dos extratos (obtido através do emprego do padrão radioativo); 3) a massa inicial do material vegetal e 4) o fator de diluição na ressuspensão das frações separadas em HPLC.

2.6. Análises estatísticas

Os dados obtidos a partir das análises de carboidratos e ABA foram submetidos à análise de variância, teste F ($P \leq 0,05$) utilizando o programa SAS (versão 9.0), e as médias comparadas com o teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

3. Resultados e discussão

Níveis endógenos de carboidratos solúveis

Os conteúdos totais de carboidratos solúveis variaram nas amostras analisadas no decorrer do ciclo das culturas, nas duas condições de cultivo, sendo observadas diferenças significativas apenas em alguns tempos ao longo do período de análise, como pode ser observado nas figuras 4 e 5.

Ao longo do ciclo de cultivo das plantas no campo, a diferença entre os teores endógenos de açúcares solúveis totais (AST) da parte aérea e da base foi evidente (Figura 4A). Nas folhas, os teores tiveram um aumento significativo, do plantio até 60 dias após o plantio (DAP), momento este em que se verificou um teor de 167,8 mg g MF, estabilizando-se daí até

os 120 DAP. A partir de 120 DAP, quando as linhas do gráfico cruzaram, o teor de AST passou a ser maior na base da planta, onde aumentou substancialmente até os 160 DAP, momento em que se deu a maturação dos bulbos.

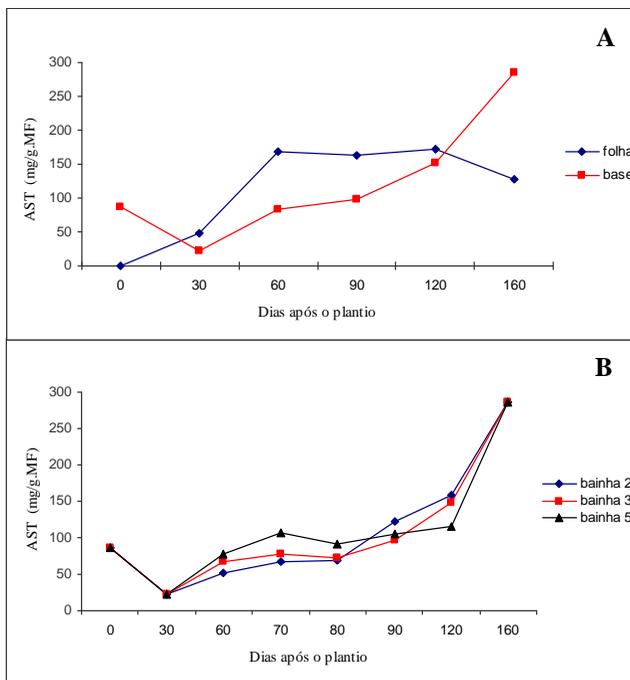


Figura 4. Níveis endógenos de açúcares solúveis totais (AST) em plantas de alho da cultivar “Jonas” cultivadas a campo. **A:** níveis de AST na parte aérea e na base de plantas; **B:** níveis de AST na base das bainhas da 2^a, 3^a e 5^a folha. Os valores são médias de três determinações. Florianópolis-SC (UFSC), 2011.

É provável que esta inversão tenha ocorrido a partir do momento que a planta passou a atender a uma forte demanda de fotoassimilados para enchimento do bulbo em início de formação na sua base, uma vez que, até aproximadamente 120 dias, a planta prioriza a formação do seu aparato fotossintético (Burba, 1983), e esse acúmulo de açúcar verificado na parte aérea elevaria o pool de carbono e energia disponível para indução e crescimento do bulbo. Ainda na Figura 4A, é notório um

decréscimo de carboidratos na base da planta, no período compreendido entre o plantio até os 30 DAP, provavelmente decorrente do aporte de reservas do bulbilho-semente para promover o desenvolvimento inicial da planta.

A Figura 4B mostra as alterações que ocorreram nos níveis de AST na base das bainhas de folhas, região onde se dá a diferenciação de células para formação de bulbilhos (detalhe na Figura 1B deste capítulo). Observou-se diferenças de concentração de AST entre as três bainhas de folhas analisadas. No período entre 30 até aproximadamente 90 DAP, as bainhas localizadas mais internamente no bulbo (bainhas 2 e 3) apresentaram teores mais baixos de AST em relação a bainha mais externa (bainha 5), mais evidenciado entre 60 a 80 DAP. Contudo, observou-se um expressivo aumento dos teores dos 80 aos 120 DAP de 129,7% na bainha 2, e de 104,2% na bainha 3, ao passo que, no mesmo período, verificou-se um aumento de apenas 25,4% na bainha 5.

Diversos trabalhos com alho nobre relatam que a diferenciação de gemas e posterior formação de bulbilhos, processo denominado de “diferenciação”, em condição de cultivo a campo, ocorre entre 80 a 110 dias após o plantio das sementes, variando conforme a cultivar e a condição climática local (Mann, 1952; Aoba e Takagi, 1971; Carvalho et al., 1980; Ferreira et al., 1986; Biasi & Mueller, 1999). Neste contexto, considerando que em alho “nobre” a diferenciação de gemas ocorre com maior frequência nas axilas das folhas mais internas (Epagri-dados não publicados), tais resultados contribuem para reforçar a hipótese de que o teor endógeno de carboidratos solúveis seria um importante fator nas fases iniciais para induzir a bulbificação em plantas de alho (Shah & Khotari, 1973; Arguello et al., 1986), atuando como fonte de energia e/ou como sinalizadores.

Resultados semelhantes aos observados neste trabalho foram reportados em outras espécies formadoras de órgãos de armazenamento. Em *X. sagittifolium*, Tsafack et al. (2009) encontraram maiores teores de carboidratos solúveis na base das plantas durante o período indutivo da tuberação, relatando também haver efeitos da condição de cultivo e do genótipo. Allemann & Hammes (2006) atribuem aos carboidratos a habilidade de algumas espécies para induzir a formação de órgão de armazenamento, sobretudo, favorecendo o desenvolvimento do mesmo em detrimento do aporte mobilizado da parte aérea.

Os níveis absolutos de AST determinados nas plantas cultivadas *in vitro* foram, na média das avaliações ao longo do ciclo, cerca de 23 vezes

menor do que aqueles observados nas plantas cultivadas no campo (Figuras 5A e 5B). Numa condição ambiental que consideramos padrão de cultivo *in vitro*, ou seja, temperatura: $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo: 16h/luz e intensidade luminosa: 60 a 70 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, verificou-se um aumento substancial do teor de AST na base, no intervalo entre 15 e 20 dias após a transferência das plantas para o meio de bulbificação (DAT) (Figura 5A). Ainda na base, um aumento praticamente linear dos teores seguiu-se a partir dos 25 até 70 DAT.

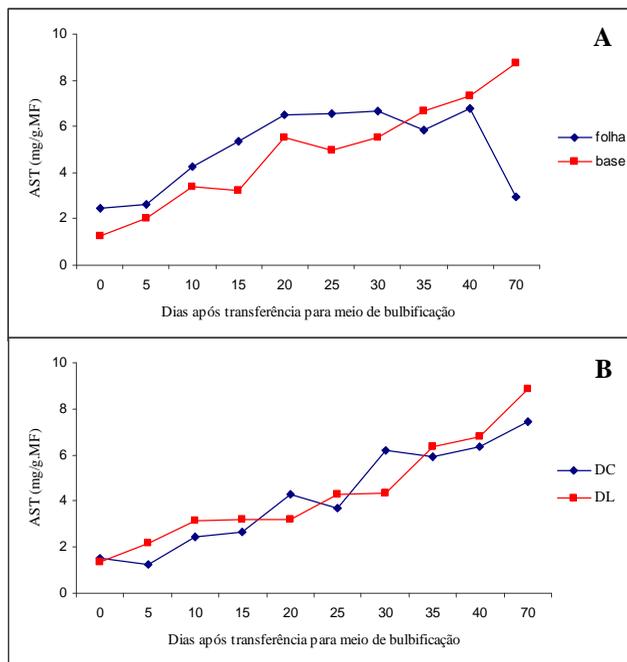


Figura 5. Níveis endógenos de açúcares solúveis totais (AST) na parte aérea e na base de plantas de alho da cultivar “Jonas” cultivadas *in vitro*. **A:**) níveis de AST na parte aérea e na base de plantas; **B:** níveis de AST na base de plantas cultivadas sob temperatura de 10°C e fotoperíodo curto (DC) e longo (DL). Os valores são médias de três determinações. Florianópolis-SC (UFSC), 2011.

Esse significativo acréscimo dos teores endógenos de açúcares observado aos 20 DAT, antecede o momento do início da redução da

razão bulbar para taxas inferiores a 0,5 (observar Figura 7 do capítulo 2), porém, em tais condições de cultivo, esta alteração não foi suficiente para induzir a diferenciação de gemas nas axilas de folhas, como sugere Arguello et al. (1986) em plantas de alho cultivadas em condição de campo.

Nas folhas, observou-se um padrão diferente nos teores de AST. Do 5° ao 40° DAT houve um aumento de 2,60 para 6,78 mg/g.MF, seguido de um substancial decréscimo da concentração para o nível de 2,96 mg/g.MF no final do ciclo, aos 70 DAT. Diferentemente do que ocorreu com as últimas amostras de folhas coletadas de plantas cultivadas no campo, as últimas amostras de folhas coletadas de plantas *in vitro*, aos 70 DAT, já se encontravam em avançado estado de senescência, que pode ser atribuído aos baixos teores de açúcares solúveis encontrados. Este fato, no entanto, também pode estar relacionado a um processo de envelhecimento precoce da planta, favorecido pelas condições em que as mesmas foram cultivadas (Longo, 2009).

Nas duas condições de fotoperíodo a que foram submetidas as plantas (Figura 5B), nota-se que houve um comportamento diferenciado entre as respectivas curvas do gráfico que correspondem aos teores de AST na base da planta, indicando possíveis efeitos da condição ambiental sobre o metabolismo de carboidratos. Sob fotoperíodo curto (DC) e temperatura reduzida para 10°C, houve uma oscilação nos teores de AST entre o 15° e 35° DAT, com dois picos observados nesse período, aos 20 e aos 30 DAT, sendo estes os dois únicos momentos em que essa curva se sobrepôs à curva correspondente aos teores de AST das plantas cultivadas sob fotoperíodo longo (DL).

A influência da temperatura sobre a fisiologia das plantas tem sido demonstrada para vários órgãos e tecidos (Dodd et al., 2002). A adaptação das plantas a diferentes temperaturas pode estar relacionada a variações nas concentrações de vários compostos, incluindo-se os carboidratos (Salisbury & Ross, 1991; Larcher, 2006). Quando plantas tolerantes ao frio, como é o caso da maioria das espécies pertencentes ao gênero *Allium*, são submetidas a temperaturas baixas ocorrem alterações em diversos processos fisiológicos e metabólicos, que por sua vez afetam os níveis de carboidratos (Guy et al. 1992). Segundo Kaplan et al. (2006), é sabido que temperaturas baixas estimulam a redução do teor de amido e o simultâneo aumento de açúcares solúveis em plantas e que este aumento parece estar associado a tolerância ao frio em muitas espécies. Em *A. wakegi*, a exposição de plantas ao frio resultou no acúmulo de sacarose e de açúcares redutores, fenômeno igualmente

observado em bulbos de *Lilium sp.* (Miller & Langhans, 1990) e em bulbos de *H. orientalis* (Rudnicki & Norwak, 1976).

Os resultados acima parecem estar de acordo aos obtidos no presente trabalho, considerando que os teores endógenos de AST apresentaram oscilações durante a fase inicial da bulbificação do alho quando a temperatura foi reduzida para 10°C, em regime de fotoperíodo curto. As amostras submetidas à esta condição ambiental apresentaram nos primeiros 30 dias de cultura em meio de bulbificação aumentos significativos dos teores de carboidratos solúveis, evidenciados por momentos de picos durante esse período.

Além do importante papel da temperatura e de carboidratos na indução e subsequente crescimento *in vitro* de órgãos de reserva (Rudnicki & Norwak, 1976), tem sido proposto que fotoperíodo curto também otimiza o crescimento ativo de tubérculos pelo aumento da mobilização de carboidratos solúveis. Resultados similares foram observados em *S. tuberosum* onde a temperatura noturna baixa, combinada com dias de fotoperíodo curto, promoveu um processo de tuberização rápido e sincronizado (Charles et al., 1993).

Os relatos apontam que a tuberização em batata é desencadeada por um estímulo exportado a partir de folhas Gregory (1956), o mais provável, em resposta ao fotoperíodo mais curto do que um crítico, que por sua vez varia de acordo com a cultivar (Ewing & Wareing 1978; Allemann & Hammes 2006). Recentemente Tsafack et al. (2009) avaliaram os efeitos do fotoperíodo e temperatura na microtuberização de taioba (*X. sagittifolium*) e observaram aumentos significativos dos teores de carboidratos solúveis na base da plantas sob fotoperíodo curto de 8h/luz. Além disso, especula-se que, sob fotoperíodo curto, hormônios indutores de tubérculos são produzidos em folhas e translocados para o ápice dos estolões (Ewing & Wareing 1978; Rodriguez et al. (2006).

No presente trabalho, sob as condições de temperatura reduzida de 10°C e fotoperíodo curto de 11h/luz impostas às plantas, além do acúmulo observado de carboidratos necessários para o desenvolvimento do bulbo, ocorreram alterações morfológicas no bulbo em sua fase inicial de desenvolvimento. Observou-se a formação de gemas nas axilas de folhas em mais de 50% dos microbulbos desenvolvidos, além da produção de um considerável número de bulbos por planta e uma excelente taxa de bulbificação.

É importante ressaltar que em condições de cultivo de alho nobre vernalizado a campo, nas regiões mais próximas da linha do equador, o

comprimento do dia (mais curto nessas regiões) não limita a diferenciação de gemas e a bulbificação em plantas de alho, logo, pode-se inferir que fotoperíodo longo não é fator indispensável para induzir a bulbificação, como sugere a literatura. Outro fato que também corrobora essa teoria é que explantes vernalizados são induzidos à formação de bulbos *in vitro*, independente do fotoperíodo, conforme constatado em experimentos do Capítulo 2.

Contudo, é improvável que tais condições sejam causas únicas do evento da diferenciação. Em sistemas *in vitro*, os teores endógenos e a disponibilidade de açúcares e de outras substâncias também podem ser afetados pela adição de outros componentes ao meio de cultura, como reguladores de crescimento (Tsafack et al., 2009) e pela condição ambiental. Logo, a combinação e a interação desses fatores podem alterar a regulação de processos fisiológicos e conseqüentemente o controle da diferenciação e indução da bulbificação em culturas de alho *in vitro* a partir de células meristemáticas.

Níveis endógenos de Ácido Abscísico (ABA)

Nas figuras 6 e 7 estão apresentados os teores endógenos de ácido abscísico (ABA) ao longo dos ciclos de plantas de alho cultivados a campo e *in vitro*. Observa-se que aos 30 dias após o plantio, na condição de campo, o nível de ABA na base da planta teve uma redução significativa, de 164,4 para 89,1 pmol/g.MF (Figura 6A). Esta relação entre o declínio de ABA no bulbilho-semente de alho e o desenvolvimento inicial da planta tem sido atribuída à completa liberação da dormência (Arguelo et al., 1983 e 1986), verificado também em *P. tuberosa* (Nagar, 1995) e *A. wakegi* (Yamazaki et al., 1995 e 2002).

Apesar de sua importância em diversos eventos vegetais parece relevante considerar que o ABA, por si só, não pode necessariamente inibir o crescimento de sementes dormentes (Khan, 1975). Nesse intervalo de tempo pode estar relacionado outros fatores desconhecidos (Xu et al., 2006) que podem estar envolvidos na inibição de muitos processos metabólicos existentes durante o desenvolvimento vegetal, como compostos fenólicos e outros reguladores de crescimento (Peres et al., 1997).

É provável que o acúmulo de ABA observado no bulbo aos 160 DAP (Figura6A) tenha sido mobilizado juntamente com os

fotoassimilados produzidos na parte aérea. Tal característica foi uma constante nas análises deste trabalho, o que, de certa forma, corrobora a hipótese de que o acúmulo de ABA no bulbo é responsável por desencadear a dormência na fase final de crescimento da planta, também observado nos experimentos de Arguello et al. (1983 e 1986).

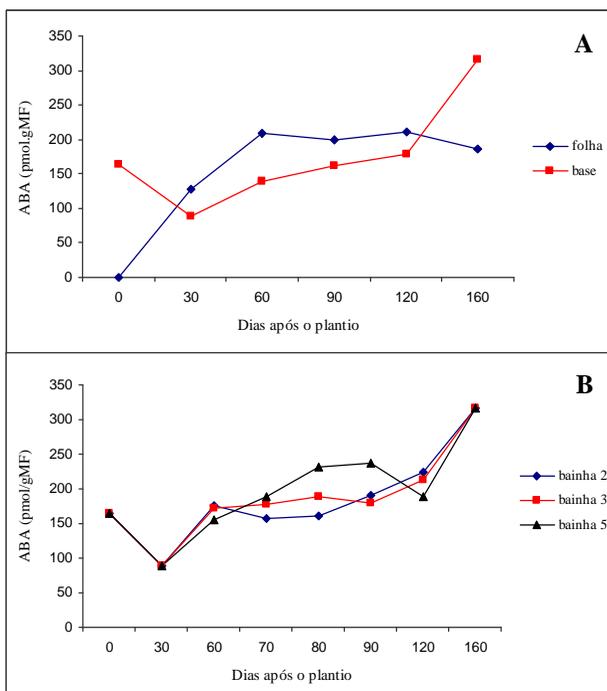


Figura 6. Níveis endógenos de ácido abscísico (ABA) em plantas de alho da cultivar “Jonas” cultivadas a campo. A: níveis endógenos de ABA na parte aérea e na base de plantas; B: níveis endógenos de ABA na base das bainhas da 2^a, 3^a e 5^a folha. Os valores são médias de três determinações. São Paulo, SP (USP), 2011.

Para verificar um suposto envolvimento do ABA na diferenciação de células das axilas de folhas para formação de bulbilhos (dentes), também foram analisados os níveis desse hormônio na base de bainhas de folhas férteis (bainhas 2 e 3) e estéreis (bainha 5) (Figura 6B). Cabe ressaltar que os teores de ABA correspondentes aos pontos zero, 30 e

160DAP nesta Figura, são os mesmos para as três bainhas analisadas, pois se tratam de valores determinados na base da planta, mostrados na Figura 6A. Essa mesma observação também é válida para AST em relação as Figuras 4A e 4B, na qual os mesmos valores foram conservados nos pontos zero, 30 e 160 DAP nos dois gráficos.

Observou-se uma concentração superior de ABA na base da bainha mais externa do bulbo (bainha 5), a partir dos 70 DAP até aproximadamente 100 DAP, com um pico de 237,7 pmol g MF verificado aos 90 DAP. Nas bainhas 2 e 3 houve um comportamento semelhante dos teores endógenos de ABA no período entre 60 as 120 DAP. Dos 120 DAP até o final do ciclo o mesmo padrão foi verificado para as três bainhas analisadas.

Esta observação, entretanto, não é consistente com resultados obtidos com outras espécies do gênero avaliadas *in vitro*. Em plantas de *A. Wakegi*, a concentração de ABA encontrada foi maior em bainhas mais interiores do que em bainhas mais exteriores dos bulbos (Yamazaki et al., 1995) e foi mais baixa do que em gemas de bulbos inteiros (Yamazaki et al., 1999). Resultados também evidenciados em bulbos de *L. rubellum*, em estudo realizado para compreender a libertação de dormência em cultivo em baixa temperatura.

Em condição ambiental padrão de cultivo *in vitro*, ficou demonstrado uma maior concentração endógena de ABA nos tecidos da base em todo o ciclo de cultivo, não havendo indicação da existência de correlação entre esse metabólito e os padrões de crescimento e desenvolvimento do bulbo nesta condição (Figura 7A). Verificou-se somente um momento de alteração significativa, dos 35 aos 40 dias. Este aumento do nível endógeno de ABA, observado nas folhas nesse período, pode ter sido o responsável por induzir/ativar o início do processo de senescência da planta, já que, dos 40 até os 70 DAT, observou-se um rápido envelhecimento da parte aérea, caracterizado por sintomas de necrose e secamento das folhas (Figura 8).

Os valores plotados na Figura 7B, foram determinados a partir de amostras de plantas cultivadas *in vitro* sob condição ambiental que induziu diferenciação de gemas (identificada em experimento do Capítulo 2). Nesta análise, sob o efeito do fotoperíodo curto (DC), os teores de ácido abscísico presentes foram significativamente inferiores aos observados em plantas desenvolvidas sob fotoperíodo longo (DL), praticamente em todo o período analisado, sendo verificado teores médios de 100,57 pmol g MF e 121,86 pmol mg MF, respectivamente. Dos 15 aos 25 DAT, período observado neste trabalho como crítico da

bulbificação *in vitro*, houve um aumento do teor nas plantas submetidas ao fotoperíodo longo, seguido de uma estabilização até os 40 DAT. Por outro lado, nenhuma alteração significativa foi evidenciada nas plantas cultivadas sob regime de fotoperíodo curto neste mesmo período.

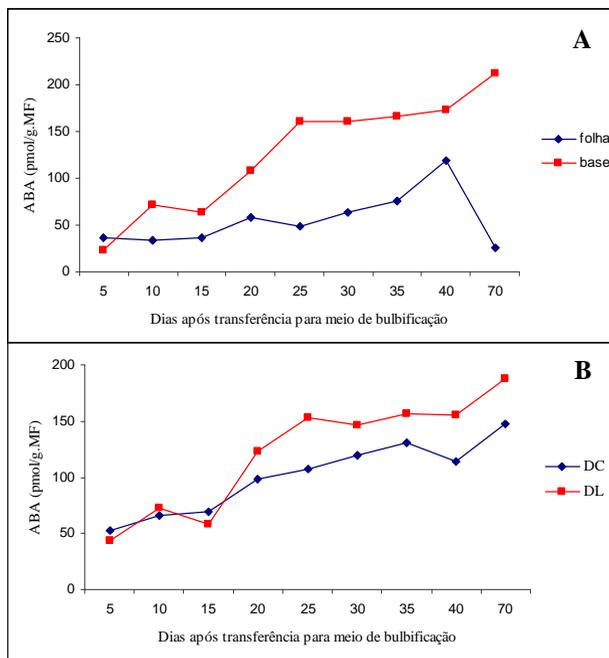


Figura 7. Níveis endógenos de ácido abscísico (ABA) em plantas de alho da cultivar “Jonas” cultivadas *in vitro*. **A:** níveis de ABA na parte aérea e na base das plantas; **B:** níveis de ABA na base de plantas cultivadas sob temperatura de 10° C e fotoperíodo curto (DC) e longo (DL). Os valores são médias de três determinações. São Paulo, SP (USP), 2011.

Esses resultados sugerem um efeito do regime de luz sobre o metabolismo do ABA em plantas de alho regeneradas *in vitro*, que, sob fotoperíodo longo, induziria a produção desse hormônio em níveis mais elevados, que por sua vez estaria inibindo a diferenciação de células meristemáticas nas axilas de folhas para posterior formação de bulbilhos. Um outro fato que reforça essa teoria, é que as condições naturais, de temperatura e de fotoperíodo nas quais as plantas foram

cultivadas no campo, foram semelhantes às condições impostas para as plantas cultivadas *in vitro*, onde se observou a diferenciação de gemas em mais de 50% dos microbulbos produzidos.

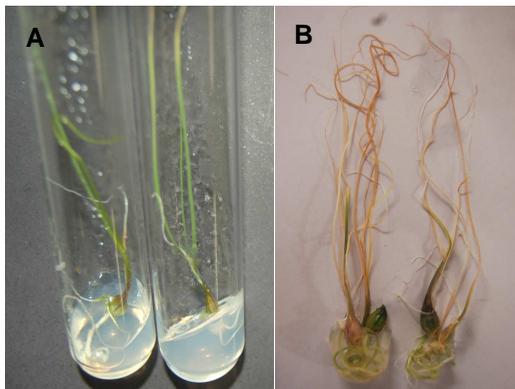


Figura 8 - Plantas de alho amostradas para análise de Ácido Abscísico e carboidratos solúveis aos 35 dias (A) e aos 70 dias (B) após transferência para o meio de cultura de bulbificação. Caçador, SC, 2011.

O teor endógeno de ABA encontrado nos tecidos das plantas parece ser regulado por uma combinação de síntese, metabolismo de importação e exportação e desativação (Walton, 1988). Esse autor considerou que mudanças do meio ambiente podem acarretar alterações em grandes proporções nos teores endógenos desse hormônio. Assim, uma outra questão de relevância na discussão sobre a função e modo de ação do ABA nos vegetais é a análise de sua distribuição e dos seus derivados dentro das células e órgãos.

O conhecimento da localização do ABA nos tecidos do alho aqui estudado, talvez fornecessem dados para uma melhor compreensão a respeito da influência do ambiente sobre seus teores e sobre uma possível correlação com a indução do processo de bulbificação, já que, ao extrair por maceração, as quantidades de ABA dos vários compartimentos fazem parte de uma somatória, dificultando a análise dos teores efetivamente ativos desse hormônio.

4. Conclusões

Os teores endógenos de Açúcares Solúveis Totais encontrados em plantas de alho cultivadas no campo e *in vitro*, apresentaram padrões de valores diferentes no decorrer do período das análises. Os teores nas plantas cultivadas em condição de campo foram, na média, cerca de 23 vezes maior em relação aos teores das plantas cultivadas *in vitro*.

Os maiores teores de ABA encontrados nas bainhas mais externas de folhas de plantas cultivadas no campo sugerem que a diferenciação de gemas também pode estar sob o controle do ABA, visto que, na condição de cultivo a campo, a diferenciação ocorre com maior frequência nas axilas de folhas mais internas, ou seja, nas últimas folhas expandidas da planta. Além disso, neste trabalho, o ABA apresentou teores mais reduzidos nessas folhas, coincidindo com o período crítico da bulbificação.

A indução da diferenciação e bulbificação de alho *in vitro* estabeleceu-se entre 15 a 25 dias após a transferência de plantas para meio de cultura de bulbificação e na condição ambiental de cultivo com temperatura na faixa de 5 a 10°C e fotoperíodo curto de 11h/luz.

Os aumentos pontuais verificados dos teores de AST e a inexistência de alterações dos teores de ABA na base das plantas durante este período podem ter sido as causas da ocorrência de diferenciação de gemas nas axilas das folhas mais internas em mais de 50% dos bulbos produzidos *in vitro*. Entretanto, para identificar a real importância dessas substâncias no processo de bulbificação, sugere-se um estudo minucioso da histodiferenciação de bulbos para relacioná-lo com maior precisão ao momento exato da diferenciação durante a ontogênese de plantas, visto que, os padrões de alteração nos níveis endógenos de ABA e AST encontrados nas plantas cultivadas a campo e *in vitro*, foram similares ao longo dos ciclos de cultivo.

5. Referências Bibliográficas

ALLEMANN, J.; HAMMES, P.S. Effect of photoperiod on tuberization in the Livingstone potato (*Plectranthus esculentus* N.E.Br. *Lamiaceae*). **Field Crop Research**, v.98, n.1, p.76–81. 2006.

AMMIRATO, P. V. Growth and morphogenesis in cultures of the monocot yam *Dioscorea*. In: FUJIWARA, A (Ed.). **Plant tissue culture**, p.169-170. 1982.

AOBA, T.; TAKAGI, H. Studies on bulb formation in garlic plants. III. The effects of cooling treatment of the seed bulb and of daylength during the growing period on bulb formation. **Journal of the Japanese Society of Horticultural Science**, Tokio, v.49, n.3 p.240-241. 1971.

ARGUELLO, J. A.; BOTINI, R.; LUNA, R.; DE BOTINI, G.A.; RACCA, R.W. Dormancy in Garlic (*Allium sativum* L.) cv. Rosado Paraguayo I. Levels of Growth Substances in Seed Cloves under Storage. **Plant Cell Physiology**, v.24, n.8, p. 1559-1963. 1983.

ARGUELLO, J. A.; DE BOTTINI, G. A.; LUNA, R.; BOTTINI, R. Dormancy in Garlic (*Allium sativum* L.) cv. Rosado Paraguayo II. The Onset of the process during Plant Ontogeny. **Plant Cell Physiology**, v.27, n.3, p.553-557. 1986.

ASCOUGH, G.D.; ERWIN, J.E.; VAN STADEN, J. In vitro storage organ formation on ornamental geophytes. **American Society for Horticultural Science**, v.34, p.417–444. 2008.

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

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.

CARRIER, D. J.; KENDALL, E. J.; BOCK, C. A.; CUNNINGHAM, J.E.; DUNSTAN, D. I. Water content, lipid deposition, and (+)- abscisic acid content in developing white spruce seeds. **Journal of Experimental Botany**, v.50, p.1359-1364. 1999.

CARRIER, D.J.; KENDALL, E. J.; BOCK, C. A.; CUNNINGHAM, J. E.; DUNSTAN, D. I. Water content, lipid deposition, and (+)- abscisic acid content in developing white spruce seeds. **Journal of Experimental Botany**, v.50, p.1359-1364. 1999.

CARVALHO, C.G.S.; MONNERAT, P.H.; CARVALHO, Y. Efeito de tratamentos pré-plantio de bulbilhos de alho cv. Amaranthe. **Revista de Olericultura**, v.15, n.1, p.165-173. 1980.

CHARLES, G.; ROSSIGNOL, L.; ROSSIGNOL, M. A synchronous model perfecting for fundamental studies on the tuberization process. **Journal of Plant Physiology**, v.142, p.474-479. 1993.

DODD, A. N.; BORLAND, A. M.; HASLAM, R. P.; GRIFFITHS, H.; MAXWELL, K. Crassulacean acid metabolism: plastic, fantastic. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.359, p. 569-580. 2002.

DUBOIS, M.; GUILLES, A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry** v.28, p.350-355. 1956.

EWING, E.E.; WAREING, P.F. Shoot, stolon and tuber formation on potato (*solanum tuberosum* L.) cuttings in response to photoperiod. **Plant Physiology**, v.61, p.348-353. 1978.

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.

FORSLINE, P. L.; LANGILLE, A. R. Endogenous cytokinins in *Solanum tuberosum* as influenced by photoperiod and temperature. **Plant Physiology**, v.34, p. 75-77. 1975.

FORSLINE, P. L.; LANGILLE, A. R. An assessment of the modifying effect of kinetin on in vitro tuberization of induced and non-induced

tissues of *Solanum tuberosum*. **Canadian Journal Botany**, v.54, p.2513-2516. 1976.

GREGORY, L. E. Some factors affecting tuberization in the potato plant. **American Journal of Botany**, v.43, p.281-288. 1956.

GUY, C. L.; HUBER, J. L.; HUBER, S. C. Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. **Plant Physiology**, v.100, p.502-508. 1992.

HUSSEY, F.; FALAVIGNA, F. Origin and production of *in vitro* adventitious shoots in the onion (*Allium cepa* L). **Journal of Experimental Botany**, London, v.31, n.125, p.1675-1686. 1980.

JEAN, M.; CAPPADOCIA, M. Effects of some growth regulator on *in vitro* tuberization in *Dioscorea alata* L. 'Brazo fuerte' and *D. abyssinica* Hoch. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.11, n.1, p.34-38. 1992.

KAPLAN, F.; SUNG, D.Y.; GUY, C.L. (2006) Roles of amylase and starch breakdown during
KENDE, H.; ZEEVAART, J. A. D. The five "classical" plant hormones. **The Plant Cell**, v.9, p.197-1210. 1997.

KHAN, A.A. Primary, preventive and permissive roles of hormones in plant system. **Botanical Review**, 4, 391-420. 1975.

LANG, G. A., MARTIN, G. C.; DARNELL, R. L. Ende-para and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. **HortScience**, v.22, p.371-377. 1987.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**, RiMa, Sao Carlos, SP, 398p. 2006.

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.

LOU, H., OBARAOKEYO, P., TAMAKI, M.; KAKO, S. Influence of sucrose concentration on *in vitro* morphogenesis in cultured cucumber

cotyledon explants. **Journal of Horticultural Science**, v.71, p.497-502. 1996.

MALDINEY, R.; LEROUX, B.; SABBAGH, I.; SOTTA, B.; SOSSOUNTZOV, L.; MIGINIAC, E. A. biotin-avidin-based enzyme immunoassay to quantify three phytohormone: auxin, abscisic acid and zeatin-riboside. **Journal of Immunology Methods**, v.90, p.151-158. 1986.

MANN, L. K. Anatomy of the garlic bulb and factors affecting bulb development. **Hilgardia**, Berkeley, v.21, n.8, p.195-249. 1952.

MANOZZO GALANTE, R. **Extração de Inulina do alho (*Allium sativum* L. var. Chonan) e simulação dos processos em batelada e em leito fixo**. Dissertação. UFSC, 2008.

MATSUBARA, S.; KIMURA, I. Changes of ABA content during bulbing and dormancy and *in vitro* bulbing in onion plant. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v.59, p. 757-762. 1991.

MAUK, C. S.; LANGILLE, A. R. Physiology of tuberization in *Solanum tuberosum* L. Cis-zeatin riboside in the potato plant: Its identification and changes in endogenous levels as influenced by temperature and photoperiodo. **Plant Physiology**, v.62, p.438-442. 1978.

MENEZES SOBRINHO, J.A. **Cultivo do alho (*Allium sativum* L.)**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA/CNPQ, 1997. 16 p. (Instruções Técnicas, 2).

MILLER, W.B.; LANGHANS, R.W. Low temperature alters carbohydrate metabolism in Easter lily bulbs. **HortScience**, v.25, p. 463-465. 1990.

MOHAMED-YASSEN, Y.; SPLITTSTOESSER, W. E.; LITZ, R. E. *In vitro* shoot proliferation and production of sets from garlic and shallot. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Netherlands, v. 36, p.243-247. 1994.

NAGAR, P.K. Changes in abscisic acid, phenols and indoleacetic acid in bulbs of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.) during dormancy and sprouting. **Scientia Horticulturae**, v.63, p. 77–82. 1995.

PERES, L. E. P.; MERCIER, H.; KERBAUY, G. B.; ZAFFARI, G. R.; Níveis endógenos de AIA, citocininas e ABA em uma orquídea acaule e uma bromélia sem raiz, determinados por HPLC e ELISA. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.9, n.3, p.169-176. 1997.

POOLER, M.R.; SIMON, P.W.. Garlic flowering in response to clone, photoperiod, growth temperature, and cold storage. **HortScience**, v. 28, n. 1, p. 1085-1086. 1993.

RACCA, R. W.; ABRIL, A.; NOME, S. F. Microbulbificación *in vitro* em ajos de sanidad controlada. In: 12º. Congreso Latino de Horticultura, Santa Fé, Argentina, **Resumen**, p.48. 1989.

RODRIGUES, B. M. **Micropropagação e bulbificação in vitro de cebola (*Allium cepa* L.)**. 109f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura de Lavras (ESAL), Lavras. 1994.

RODRIGUEZ, F.M.; BOU. J.; PRAT, S. Seasonal control of tuberization in potato: conserved elements with the flowering response. **Annual Review of Plant Biology**, v.57, p.151–180. 2006.

RUDNICKI, R.M.; NORWAK, J. Studies on the physiology of hyacinth bulbs (*Hyacinthus orientalis* L.). **Journal of Experimental Botany**, v.27, p. 303–313. 1976.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology**, 4ed. California; Wadsworth Publishing Company, 1991. 682p. 1991.

SARKAR, D. The signal transduction pathways controlling in planta tuberization in potato: an emerging synthesis. **Plant Cell Reports**, v.27, p.1–8. 2008.

SATO, A. Y.; SEDIYAMA, T.; BORÉM. A.; CECON, P. R.; JUNQUEIRA, C. S. Influência do ácido abscísico na micropropagação da cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Acta Scientiarum Maringá**, v. 23, n. 5, p. 1235-1237. 2001.

SHAH, J. J.; KOTHARI, I. L. Histogenesis of garlic clove. **Phytomorphology**, v.23, p. 162-170. 1973.

SLATER, J. W. The effect of night temperature on the initiation of the potato. **Euro-Potato Journal**, v.11, p.14-32. 1968.

SOTTA, B.; PILLATE, G.; PELESE, F.; SABBAGH, I.; BONNET, M.; MALDINEY, R. An avidin-biotin solid phase ELISA for femtomole isopentenyladenine and isopentenyladenosine measurements in HPLC purified plant extracts. **Plant Physiology**, v.84, p.571-573. 1987.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, p. 450 – 540. 2004.

THOMAS, T. H.; ISENBERG, F. M. Hormone physiology of onion bulbs during dormancy. **Experimental Horticulturae**, v.23, p. 48–51. 1972.

TSAFACK, T. J. J.; GILBERT, P.; OMOKOLO, N. D.; BRANCHARD, M. Effect of photoperiod and thermoperiod on microtuberization and carbohydrate levels in Cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott). **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v.96, p.151–159. 2009.

VERMA, D.C.; DOUGALL, D.K, Influence of carbohydrates on quantitative aspects of growth and embryo formation in wild carrot suspension cultures. **Plant Physiology**, v.59, p.81-85. 1977.

WANG, Q. C.; VALKONEN, J. P.T. Efficient elimination of sweetpotato little leaf phytoplasma from sweetpotato by cryotherapy of shoot tips. **Plant Pathology**, p.338–347. 2008.

WALTON, D.C. Abscisic acid biosynthesis and metabolism. In: **Plant hormones and their role in plant growth and development**, Davies, P.J. (ed) Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p. 113-131. 1988.

XU, R. Y; NIIMI, Y.; HAN, D. S. Changes in endogenous abscisic acid and soluble sugars levels during dormancy-release in bulbs of *Lilium rubellum*. **Scientia Horticulturae**, v.111, p.68–72. 2006.

YAMAZAKI, H.; NISHIJIMA, T.; KOSHIOKA, M. Changes in abscisic acid content and water status in bulbs of *Allium wakegi* Araki throughout the year. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v.64, p. 589–598. 1995.

YAMAZAKI, H.; NISHIJIMA, T.; KOSHIOKA, M.; MIURA, H. Gibberellins do not act against abscisic acid in the regulation of bulb dormancy of *Allium wakegi* Araki. **Plant Growth Regulation**, v.36, p. 223–229. 2002.

YAMAZAKI, H.; NISHIJIMA, T.; YAMATO, Y.; MIURA, H. Involvement of abscisic acid (ABA) in bulb dormancy of *Allium wakegi* Araki I. Endogenous levels of ABA in relation to bulb dormancy and effects of exogenous ABA and fluridone. **Plant Growth Regulation**, v.29, p.189–194. 1999.

CAPÍTULO IV

ELIMINAÇÃO DE COMPLEXO VIRAL EM ALHO POR CRIOTERAPIA

1. Introdução

A eliminação de viroses é uma das principais aplicações da cultura de tecidos vegetais (Junghans et al., 2004), sendo o cultivo de meristema associado a termoterapia, a técnica mais utilizada (Parmessur et al., 2002). O meristema apical consiste na região meristemática apical, ou domo meristemático, desprovido ou com no máximo 1 a 2 primórdios foliares, e o ápice caulinar consiste no meristema apical com primórdios foliares subjacentes e, em algumas situações, com as folhas emergentes, podendo o seu tamanho variar de 0,3 a 20 mm (Torres et al., 1998).

A aplicação da cultura de meristema para erradicar partículas virais baseou-se inicialmente no conceito de "imunidade" do meristema para vírus (Morel 1948), porém, a razão pela qual a cúpula meristemática dificulta o colonização de vírus ainda permanece pouco conhecida. Matthews (1991) sugere que em células de planta em divisão, mRNAs que estão presentes em concentrações elevadas nas células ativas podem competir efetivamente pelo aparato de tradução com RNAs virais. O mesmo autor relata ainda que a ausência de vascularização em tecidos meristemáticos dificultaria a disseminação de vírus. Outra hipótese sugere que a interrupção temporal da organização normal dos tecidos meristemáticos ocasiona uma inibição da multiplicação do vírus devido a não disponibilidade de enzimas chaves (Ward (2009).

A associação da cultura de meristemas com a termoterapia tem colaborado para o aumento na frequência de obtenção de plantas livres de doenças. O uso da termoterapia no controle de doenças de plantas teve início de uma forma empírica no século passado, na Escócia, por meio do tratamento de bulbos de plantas ornamentais com água quente, antes dos plantios (Ghini & Bettiol, 1995). O princípio básico desta técnica consiste no fato de que a taxa de replicação do vírus na região meristemática diminui por tratamentos em determinadas relações tempo temperatura, que produzem poucos efeitos deletérios no material vegetal (Ghini & Bettiol, 1995). Neste caso, quanto maior for a diferença entre a sensibilidade térmica do hospedeiro e do patógeno, maiores serão as chances de sucesso da termoterapia (Gama & Ávila, 1998).

O mecanismo de ação da temperatura, tanto no controle de patógenos quanto na injúria do hospedeiro, é complexo, sendo que um ou vários fatores podem estar envolvidos, como desnaturação de proteínas, liberação de lipídeos, destruição de hormônios, asfixia de tecidos, destruição de reservas e injúria metabólica (Nyland & Goheen, 1969), ou por mecanismo de silenciamento de RNAs (Schwach et al., 2005).

O tratamento pelo calor pode ser feito, basicamente, de duas formas: por meio de uma intensa e curta exposição, geralmente usada para erradicação de microorganismos (Lifshits et al., 1983; Ravnikar et al., 1994) ou por meio de uma menor intensidade e longa exposição ao calor, utilizada para reduzir a concentração do patógeno na planta e, geralmente, associada à cultura de meristemas (Peña-Iglesias, 1988; Conci et al., 1992; Ravnikar et al., 1994; Torres et al., 2000; Fajardo, 2002). Para tanto, o material de propagação pode ser tratado com água quente, ar quente ou vapor (Walkey et al., 1987).

A criopreservação é definida como a conservação de material biológico em nitrogênio líquido a -196°C , ou, em sua fase de vapor, a -150°C (Santos, 2000). Essa técnica pode assegurar a conservação de material biológico por longo período de tempo, uma vez que, nessas temperaturas ultra baixas, o metabolismo celular fica tão reduzido que a deterioração biológica é virtualmente paralisada (Santos, 2000). O grande desafio para o criobiologista, entretanto, é realizar um congelamento sem a formação de cristais de gelo no interior das células (Ward, 2009). A formação de gelo no meio intracelular causa ruptura do sistema de membranas celulares, resultando em perda da semi-permeabilidade e da compartimentação celular, em consequência disso, as células entram em colapso e morrem.

Relatos sobre o sucesso da criopreservação de germoplasma de alho ainda são relativamente raros, apesar da crescente demanda dessa espécie, não só para alimentação, mas também para fins medicinais (Niwata, 1995; Hannan & Garoutte, 1996; [Makowska et al., 1999](#); Keller, 2002 e Ellis et al., 2005). Esses pesquisadores demonstraram em seus experimentos que é possível criopreservar ápices caulinares e pequenos bulbilhos de alho utilizando protocolos de vitrificação com soluções crioprotetoras PVS2 e PVS3.

Além da conservação de recursos genéticos vegetais, sob ultra-baixas temperaturas a longo prazo, a criopreservação pode ser utilizada também para a erradicação de vários patógenos em plantas, incluindo os complexos virais (Brison et al., 1997). A crioterapia de ápices caulinares

é uma técnica emergente para erradicação de patógeno a partir de plantas de diversas espécies, e a ampla utilização dessa técnica é possível porque ela depende de protocolos de criopreservação, já estabelecidos para muitas espécies de propagação vegetativa de importância econômica.

A cultura de meristemas tem sido utilizada a décadas, para eliminar vírus de plantas de propagação vegetativa. Embora a capacidade de regeneração seja positivamente proporcional ao tamanho do meristema cultivado, diferentes pesquisadores têm mostrado que a probabilidade de obtenção de plantas sem vírus é inversamente proporcional ao tamanho de meristema excisado (Faccioli & Marani, 1998; Torres et al., 1998), sendo recomendado tamanho reduzido, entre 0,1 a 0,3 mm para a maioria das espécies (Torres et al., 1998). Portanto, a erradicação do patógeno, utilizando-se meristemas minúsculos, tem sido contestada pela dificuldade da excisão do tecido e, principalmente, da não garantia de regeneração e remoção da infecção dos mesmos. Além disso, a termoterapia, geralmente associada a cultura de meristema, é um processo demorado, tendo, muitas vezes, uma baixa taxa de êxito.

Uma vantagem da crioterapia é que ela facilita o tratamento de um grande número de amostras, pois a erradicação do patógeno por este método é independente do tamanho do explante utilizado (Brison et al., 1997; Wang et al., 2003) e as células infectadas são eliminadas pelos efeitos letais da ultra-baixa temperatura, sem a necessidade de nenhuma remoção mecânica de tecidos (Wang & Valkonen, 2008). O número de plantas sobreviventes pode ser menor após a crioterapia seguida da cultura *in vitro* dos explantes, mas a diferença é compensada pela facilidade da excisão de tecidos maiores e pela maior proporção de plantas regeneradas livre de vírus (Brison et al., 1997; Wang et al., 2003; Wang & Valkonen, 2008). Desse modo, a outra vantagem da crioterapia em relação ao método tradicional, é que a necessidade de indexação para identificar plantas livres do patógeno passa a ser menor.

Helliot et al. (2002) relataram o sucesso da criopreservação para eliminação de *Banana streak virus* (BSV) em banana (*Musa sp.*) por criopreservação de ápices caulinares com diâmetro médio de 0,4 mm em solução de vitrificação PVS2. Após teste de ELISA, constataram que 90% das plantas estavam livres de BSV, contra 76% de plantas livres do mesmo vírus, obtidas com o tradicional método de cultura de meristemas associado à termoterapia. Nessa mesma linha de estudo, Wang e Valkonen (2008), relatam a eficiência da crioterapia para a erradicação de fitoplasmas em *I. batatas*, quando obtiveram 100% de

plantas livres de fitoplasmas, contra apenas 7% a 10% promovida pelo método tradicional de limpeza. Em trabalho com videira, Wang et al. (2003) demonstraram que a criopreservação resultou em mais de 95% de plantas livres de *Grapevine virus A* (GVA) após longo período de conservação *in vitro*, compartilhando com a idéia de Brison et al. (1997) de que a criopreservação pode ser considerado um método eficaz para erradicação de vários patógenos em plantas, incluindo os complexos virais.

Apesar das referências aqui citadas sobre a criopreservação de germoplasma de alho, nenhuma informação referente à avaliação do potencial do uso desta técnica para remoção de complexos virais foram reportadas até o momento. Dessa forma, estudos com enfoque no uso de protocolos de criopreservação como técnica de remoção de viroses contribuirão de maneira expressiva para melhorar o processo de limpeza clonal do alho.

Este trabalho teve como objetivos: (a) estabelecer um protocolo de criopreservação de alho utilizando a técnica de vitrificação, (b) avaliar a criopreservação como técnica potencial para erradicação de complexo viral em plantas de alho, (c) comparar a crioterapia de ápices caulinares de alho com as técnicas convencionais de limpeza de vírus em laboratório, (d) avaliar alterações na estrutura de células de ápices caulinares criopreservados causadas pelo congelamento, e (e) estabelecer um protocolo de imunolocalização de vírus em tecidos de ápices caulinares de alho.

2. Material e Métodos

Origem e preparo do material vegetal - bulbilhos de alho da cultivar “Jonas” foram coletados do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Epagri/Estação Experimental de Caçador, Santa Catarina, para o uso como fonte de explantes. Os bulbos utilizados nos experimentos foram previamente testados para comprovação da presença de vírus.

Antes do plantio, os bulbilhos foram vernalizados em câmara frigorífica a + 4°C por um período de 30 dias para realização da quebra de dormência e uniformização da emergência.

2.1. Estabelecimento de protocolo para criopreservação de ápices caulinares de alho

Para definição do protocolo adequado, os ápices caulinares excisados dos bulbilhos foram submetidos a tratamentos com soluções crioprotetoras PVS2 e PVS3 (Sakai, 1990), conforme descrito a seguir:

Pré-cultura dos explantes - em câmara de fluxo laminar, os bulbilhos passaram pelo processo de assepsia em etanol 70%, seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio 1,5% por 25 minutos. Ápices caulinares com até cinco primórdios foliares, foram dissecados dos bulbilhos e introduzidos em placas de petri contendo 15 ml de meio líquido MS (Murashige e Skoog, 1962), com redução de dois terços da concentração salina (MS/3), adicionado de 3% de sacarose e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, e mantidos no escuro a 25°C por 5 dias.

Pré-condicionamento - os ápices caulinares foram transferidos para placas de petri contendo solução de MS/3 líquido e sacarose, nas concentrações 0,3M e 0,6M, e mantidos em temperatura ambiente por 24 horas em cada concentração. Completado o tempo de pré-condicionamento, as soluções anteriores foram substituídas pelas soluções crioprotetoras PVS2 e PVS3. Os ápices foram transferidos para placas de petri e tratados por zero, 60, 120, 180 e 240 minutos, em temperatura ambiente, com as soluções de vitrificação PVS2 (30% de glicerol + 15% de etileno glicol + 15% de DMSO em meio MS) ou PVS3 (50% de glicerol + 50% de sacarose em meio MS). Para cada período de tratamento houve uma renovação da solução na metade do tempo. Ao final de cada tratamento, pipetou-se 1 ml das soluções PVS2 ou PVS3 em criotubos de polipropileno estéril de 2ml contendo 5 ápices em cada criotubo. Em seguida os criotubos, devidamente identificados por tratamento, foram transferidos para um canister o qual foi introduzido em um container com nitrogênio líquido (+NL), onde permaneceram por 5 horas. Para cada tratamento houve uma testemunha correspondente, ou seja, não submetida ao nitrogênio líquido (-NL). Os tratamentos foram constituídos pelos tempos de exposição dos explantes nas soluções crioprotetoras. Cada tratamento foi repetido cinco vezes, sendo a repetição constituída por um criotubo contendo 5 ápices caulinares, totalizando 25 ápices por tratamento.

Recuperação dos explantes - depois de cinco horas, os criotubos foram retirados do NL, esterilizados com etanol 70% e, no interior da cabine de fluxo de ar laminar, foi pipetado 1 ml de solução de sacarose 0,3M antes de levá-los para banho Maria (40°C) por 2 minutos. De volta para

cabine de fluxo de ar, a solução de sacarose foi removida e os ápices foram introduzidos em tubos de ensaio de 10mm x 100mm contendo 3 ml de meio de cultura MS/3 suplementado com sacarose (3%), BAP ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) 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. Os tubos de ensaio foram selados com PVC e mantidos no escuro a 25°C por 5 dias. Após este período, as culturas foram transferidos para sala de crescimento a 25°C , fotoperíodo de 16h/luz e intensidade luminosa de 60 a $70 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, proporcionada por lâmpadas fluorescentes frias.

Avaliação da sobrevivência dos explantes - foram definidas duas fases para avaliação da viabilidade dos tratamentos: 15 dias, em função de evidências de esverdeamento e inchaço dos ápices meristemáticos e após 30 dias, por meio da contagem do número de ápices que produziram folhas novas.

2.2. Comparação da eficiência de métodos de limpeza de vírus em alho

Para testar a eficiência entre os métodos de limpeza clonal, explantes retirados de bulbilhos de alho da cultivar Jonas, naturalmente infectados com *Onion yellow dwarf virus* (OYDV), *Leek yellow strip virus* (LYSV) e *Garlic common latent virus* (GCLV), foram utilizados para os tratamentos de cultura de ápices caulinares, cultura de meristemas, termoterapia combinada com cultura de meristemas, crioterapia de ápices caulinares, e termoterapia combinada com crioterapia de ápices caulinares.

Neste trabalho, para efeito de entendimento, foram considerados ápice caulinar quando o meristema tinha até 5 primórdios foliares, e meristema quando havia presença de no máximo 2 primórdios.

Preparo dos explantes - após a superação da dormência em câmara frigorífica (30 dias a temperatura de 4°C), os bulbilhos foram plantados em bandejas de aço inox contendo uma mistura de substrato orgânico e vermiculita na proporção de 1:1 (v/v), para induzir brotação. As bandejas foram mantidas em estufa incubadora BOD, sob temperatura de 25°C até o início da brotação dos bulbilhos, quando os explantes foram então dissecados.

Para os tratamentos de termoterapia seguida de cultura de meristemas e termoterapia seguida de crioterapia, imediatamente após a quebra da dormência, os bulbilhos foram expostos ao tratamento de

termoterapia a 38°C por um período de 30 dias, antes do plantio em substrato para indução da brotação.

Cultura de ápices caulinares - em câmara de fluxo laminar, os explantes brotados foram esterilizados com etanol 70% seguido de imersão em solução de hipoclorito de sódio 1,5% por 15 minutos. Os ápices caulinares foram dissecados e extraídos dos bulbilhos e introduzidos em tubos de ensaio (15 mm x 100 mm) com 3 ml de meio MS/3 (Murashige e Skoog, 1962) suplementado com sacarose (3%), BAP (0,1 mg L⁻¹) 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. Após 40 dias, as plantas sobreviventes foram transferidas individualmente para tubos de ensaio (20mm x 150mm) contendo 8 ml de meio MS, suplementado com sacarose (3%), ANA (0,2 mg L⁻¹) e geleificado com ágar (0,6%) para induzir o desenvolvimento de bulbos. Em ambas as fases, as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, sob fotoperíodo de 16h/luz e intensidade luminosa de 60 a 70 μmol de fótons m⁻² s⁻¹, proporcionada por lâmpadas fluorescentes brancas.

Cultura de meristemas - foram adotados os mesmos procedimentos utilizados na cultura de ápices caulinares.

Termoterapia seguida de cultura de meristemas - após a aplicação da termoterapia nos bulbilhos, conforme já descrito anteriormente, seguiu-se a mesma seqüência de procedimentos adotadas para a cultura de ápices caulinares.

Crioterapia – Seguiu-se a mesma seqüência de procedimentos adotados para o estabelecimento do protocolo de criopreservação. Para crioterapia, os ápices caulinares foram tratados com solução crioprotetora PVS3, durante 180 minutos antes da imersão em nitrogênio líquido.

Termoterapia seguida de crioterapia - após a termoterapia dos bulbilhos doadores de explantes, seguiu-se a mesma seqüência de procedimentos adotados para o estabelecimento do protocolo de criopreservação.

2.3. Análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizados com 5 repetições, sendo a repetição constituída por um criotubo contendo 5 explantes, totalizando 25 unidades por tratamento. Foram considerados tratamentos os diferentes métodos de eliminação de vírus (limpeza de viroses) avaliados.

Os dados foram submetidos as análises de variância (teste F) utilizando o programa SAS (versão 9.0) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. As variáveis analisadas foram: taxa de sobrevivência dos explantes e número de plantas livres de vírus obtidas.

2.4. Diagnose de vírus

A diagnose do complexo viral foi realizada no laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas da Epagri/Estação Experimental de Caçador, Caçador/SC, por testes imunoenzimáticos (*Tissue printing* e Dot-blot) e no Laboratório de Microscopia Eletrônica da UnB através de análise molecular RT-PCR.

Para comprovação da presença do complexo formado pelas espécies OYDV, LYSV e GCLV, bulbos e bulbilhos fornecedores de explantes foram previamente submetidos aos testes imunoenzimáticos *tissue printing* e Dot-ELISA.

Os materiais provenientes dos experimentos foram testados por Dot-blot e os resultados foram validados por amostragens, através de RT-PCR.

Tissue printing - as avaliações das amostras por *tissue printing* foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por Helguera et al. (1997), com modificações.

Os bulbos e bulbilhos provenientes do Banco Ativo de Germoplasma de alho da Epagri (Caçador/SC), foram seccionados com lâminas de bisturi e impressos em membrana de nitrocelulose (BIO-RAD Trans-Blot[®], com poro de 0,2 µm) divididas em pedaços de 4,0 x 6,0cm. As membranas foram bloqueadas por 1 h em temperatura ambiente em solução TBS-1 (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl) acrescida de Tween 20 (0,5%), leite em pó desnatado (1%) e 20% de soro normal de cabra. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anti-soros primários contra OYDV, LYSV e GCLV, previamente

diluídos 1:1000 em tampão TBS-2 (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 0,05% de Tween 20, 1% leite em pó desnatado) sob leve agitação por 1 hora. As membranas foram lavadas no mesmo tampão e incubadas com anti-soro secundário conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) por outro período de 1 h, seguido de três lavagens com TBS 1/2X (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl) e reveladas com NBT/BCIP (Sigma) por 30 minutos sob agitação constante. Os borrões foram lavados três vezes com TBS 1/2X e uma vez com água destilada para paralização definitiva da reação.

Dot-blot: os bulbilhos matrizes doadores de explantes e aqueles gerados a partir dos experimentos, foram plantados em potes individuais de 500 ml contendo substrato orgânico esterilizado e mantidos em casa de vegetação sob temperatura de aproximadamente 25° C. Após a emergência dos bulbilhos, os vasos foram transferidos para um telado anti-afídeos e, durante o desenvolvimento inicial das plantas foram feitas amostragens da região mediana de folhas de cada tratamento, as quais foram acondicionadas em sacos plásticos, e imediatamente armazenadas em recipiente refrigerado até o momento do teste.

O Dot-Blot foi desenvolvido a partir da metodologia descrita por Stott (1989). Para cada amostra testada tomou-se 1 grama de massa fresca de folha, na fase inicial de desenvolvimento das plantas, as quais foram maceradas em 1 ml de tampão PBS ½X (10mM NaH₂.PO₄.H₂O pH 7,4 + 150 mM NaCl), centrifugadas e mantidas refrigeradas. A membrana de nitrocelulose (MNC) (BIO-RAD Trans-Blot[®], com poro de 0,2 µm) foi dividida em pedaços de 5,0 x 3,0 cm e marcadas a lápis por pontos equidistantes. Sobre cada ponto marcado adicionou-se 5 µL de sobrenadante das amostras. Nas membranas sensibilizadas com os antígenos, foram adicionados os controles positivos e negativos (BIOREBA AG, Swizerland) correspondente a cada vírus testado, sendo em seguida acondicionadas em recipiente de acrílico. Sítios livres de ligação de proteínas, eventualmente presentes nas membranas, foram bloqueados pela embebição com tampão PBS-L 1/2X (PBS com 2% de leite em pó desnatado) sob agitação leve por 2 horas.

Decorrido o tempo de agitação, o agente bloqueador foi descartado e em seguida adicionados os anti-soros contra *Onion yellow dwarf virus* (OYDV), *Leek yellow stripe virus* (LYSV) e *Garlic common latent virus* (GCLV) (BIOREBA AG, Swizerland) previamente diluídos 1:1.000 em PBS 1/2X, e incubados nas membranas sob agitação leve por 4 horas. Ao final do período, os anti-soros foram descartados e as membranas

foram incubadas com anti-soro secundário conjugado com fosfatase alcalina (Sigma), diluído 1:2.000 em PBS 1/2X sob agitação leve por 2 horas em temperatura ambiente. Decorrido o tempo de incubação, as membranas foram reveladas com NBT/BCPI diluídos em tampão de revelação ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 5 mM, NaCl 100 mM, Tris HCl pH 8,9 100 mM) sob agitação leve, no escuro, por 30 minutos. Entre cada etapa foram realizadas 4 lavagens das fatias de membranas sendo, uma com PBS-T 1/2X e três com PBS 1/2X. A reação foi paralisada com a imersão das membranas em água destilada durante 10 minutos em temperatura ambiente e, em seguida mantidas em bancada para secar. Na leitura foram considerados positivos todos aqueles soros que desenvolveram uma reação de cor roxa rosada, fraca ou forte. O soro negativo não desenvolveu cor. As reações foram repetidas duas vezes, sendo testadas amostras de todas as plantas, obtidas em cada método de limpeza.

As diluições dos anticorpos primários e secundários, bem como os tempos de incubação, foram previamente ajustadas para à aplicação dos testes sorológicos.

RT-PCR (Transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase): as amostragens foram feitas nas mesmas plantas utilizadas para o Dot-blot. O terço médio das folhas, em pleno estágio vegetativo, foi identificado e imediatamente armazenados em nitrogênio líquido. De cada amostra foram coletadas três sub-amostras de modo a evitar escape nos resultados. As amostras foram levadas ao laboratório e foram realizadas 24 extrações de RNA total com o reagente Plant RNA Reagent[®]. Para a detecção de cada espécie viral nas amostras por RT-PCR, foram utilizados 2 μ L do cDNA, incubados com 0,5 μ L dos primers específicos de OYDV, LYSV, GCLV, GarV-C, GarV-D e GarMbFV (senso e antissenso) a 10 μ M, 0,5 μ L de dNTP Mix a 10 mM, 5,0 μ L de Green Go Taq[®] Reaction Buffer 5X e 0,125 μ L de Go Taq[®] DNA polymerase (1,25 U), para um volume final de 25 μ L. A reação foi amplificada em Termociclador ESCO[®] modelo Swift Maxi utilizando-se os seguintes parâmetros na reação: desnaturação realizada a 94°C por 3 min, seguida de 30 ciclos de amplificação (94°C/1 min; 60°C/1 min; 72°C/1 min) e um ciclo final de 72°C/ 7 min para extensão final.

Como controles positivo e negativo, utilizou-se o DNA plasmidial, contendo o gene da capa protéica de cada espécie viral a ser detectado e a amostra sem DNA (água MilliQ tratada com DEPC e autoclavada), respectivamente, em cada conjunto de reações de RT-PCR realizada.

Os produtos amplificados e o marcador 1Kb DNA Ladder (Invitrogen[®]) foram aplicados em gel de agarose a 0,8%, preparado em tampão 0,5 x Tris-Borato-EDTA (TBE), submetidos à eletroforese (120 V), corados com brometo de etídio a 0,1 mg/mL e visualizados sob luz ultravioleta no aparelho Alpha Innotech[®].

2.5. Análises histológicas

As análises histológicas e ultra-estrutural foram realizadas, principalmente, com o objetivo de observar os efeitos do congelamento sobre morfologia dos explantes, e as eventuais mudanças sub-celulares causadas.

Microscopia de luz: a fixação química dos ápices caulinares foi realizada com paraformaldeído 2,5%, em solução de tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,2) por 24 horas em temperatura ambiente. Após a fixação, as amostras foram lavadas em tampão fosfato 3 vezes, 20 minutos cada, seguido de desidratação em série etílica (30, 50, 70 e 90%, 25 minutos cada e 100%, 25 minutos, 2 vezes cada). Em seguida as amostras foram infiltradas da seguinte forma: em álcool absoluto e historesina (Leica Historesin, cód. 702218500) na proporção de 1 : 1 durante 24 horas, e em historesina pura durante 24 horas, ambas as etapas em temperatura ambiente. Logo após a infiltração, as amostras foram posicionadas nos moldes em diferentes orientações, e imediatamente emblocadas em historesina pura.

Os moldes permaneceram em bancada por 24 horas e em seguida acondicionados em estufa a 38°C para completar o período de polimerização. Após a polimerização, os blocos foram removidos dos moldes. Em seguida, cortes de 5 µm de espessura foram efetuados em micrótomo (Leica, modelo RM 25) e corados com safranina (0,5%), para visualização de núcleos e parede celular e azul de toluidina (1%) para visualização de núcleos (Gurr, 1965). Os cortes foram fixados em lâminas com bálsamo do Canadá e observados em microscópio de luz (Olympus CX 41). As células sobreviventes aos tratamentos de termoterapia e crioterapia, com núcleo preservado, foram reconhecidas pelos núcleos corados com azul de toluidina.

Microscopia Eletrônica de Transmissão: explantes provenientes de bulbilhos saudáveis e infectados com vírus, foram processados para estudo das características citológicas e da morfologia celular por microscopia

eletrônica de transmissão. Ápices caulinares contendo até 5 primórdios foram dissecados e extraídos dos bulbilhos e fixados em uma solução mista de glutaraldeído (2%), paraformaldeído (2%) e sacarose 3%, em tampão cacodilato de sódio 0,05 M por 1h em temperatura ambiente, mais 12h em geladeira. Decorrido o período de fixação, o excesso dos reagentes foi removido com quatro lavagens sequenciais com tampão Cacodilato de sódio 0,05M. Em seguida, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio (2%) e incubadas em temperatura ambiente, por 1h no escuro. O pós-fixador foi retirado e o excesso foi eliminado com duas lavagens com o mesmo tampão, por 20 minutos cada. Em seguida adicionou-se às amostras uma solução de acetato de uranila (0,5%) e assim foram incubadas por 2h no escuro. O excesso do contrastante foi removido com três lavagens em água destilada por 1 minuto. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em uma série de concentrações de acetona: 30; 50, 70 e 100% e, lentamente, incorporados em resina Spurr. Foram obtidos cortes semi-finos e ultra-finos, em ultra-micrótomo com navalhas de vidro e de diamante, respectivamente. As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL[®] (modelo JEM 1011), no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina.

2.6. Análise imunocitoquímica

Processamento das amostras: amostras provenientes de bulbilhos infectados, foram fixadas em solução de Glutaraldeído 0,05% e Paraformaldeído 4% (w/v), em tampão fosfato 0,1M (pH 7.2) por 24h a 4°C. Em seguida as amostras foram lavadas 3 vezes com o mesmo tampão, 15 minutos cada. A desidratação foi realizada em série de etanol: 12,5; 25; 50; 70; 90 e 100%, 25 minutos cada, seguida de infiltração com resina LR White[®] (Sigma) na seguinte sequência: mistura de resina e etanol (100%) na proporção 1:1 por 1h, e resina pura quatro vezes com trocas a cada 12 horas, em temperatura de 4°C. A inclusão das amostras foi realizada em resina pura, em cápsulas de gelatina, e a secagem em estufa a 50°C por 24h.

Reações de Imunogold: visto que na literatura não foi encontrado nenhum trabalho de referência sobre imunodeteção de vírus em ápices caulinares de alho, um protocolo de reações de imunolocalização por

imunogold foi desenvolvido a partir do trabalho de Went et al. (1995) com adaptações na metodologia.

Secções ultrafinas de 70-80nm (preparados em LR White) foram cortadas com navalha de diamante e coletados em grids de níquel (300 mesh) revestidos com filme de Parlódio. Os grids foram flutuados por 30 minutos em solução de bloqueio BSA 1% e 0.05% de tween 20, diluídos em tampão fosfato salina (PBS) (10 mM fosfato sódio, pH 7.2, 150 mM NaCl) seguido de incubação overnight a 4°C com anti-soro contra OYDV diluídos 1:100, 1:500, 1:1000 e 1:2000, em solução de bloqueio. Os grids foram lavados várias vezes com tampão PBS 1/2X para remoção do excesso de solução e incubados por 1 hora com anti-soro anti-rabbit IgG conjugado com ouro coloidal (10nm) diluídos 1:10 e 1:100 em solução de bloqueio, em temperatura ambiente. Após várias lavagens com PBS 1/2X e uma lavagem em água destilada, os grids foram corados com acetato de uranila 2% e com citrato de chumbo a 1% e observados em microscópio JEOL[®] (modelo JEM 1011). As diluições dos anti-soros primários e secundários foram combinadas entre si para determinar o melhor ajuste do protocolo.

3. Resultados e discussão

3.1. Estado fitossanitário dos bulbilhos doadores de explantes

Foram indexados 100 bulbos de alho da cultivar “Jonas”, dos quais, 100% apresentaram-se infectados com OYDV, 85% com LYSV, e 92% com GCLV. As amostras de bulbos que apresentaram reação negativa em pelo menos um dos vírus testados, foram descartadas, sendo utilizados para a execução dos experimentos somente os bulbos infectados com as três espécies de vírus. Nas amostras submetidas ao teste imunoenzimático *tissue printing*, a reação positiva aos antissoros do complexo viral do alho foi identificada pelo desenvolvimento da cor roxa na membrana de nitrocelulose, conforme é mostrado na Figura 1.

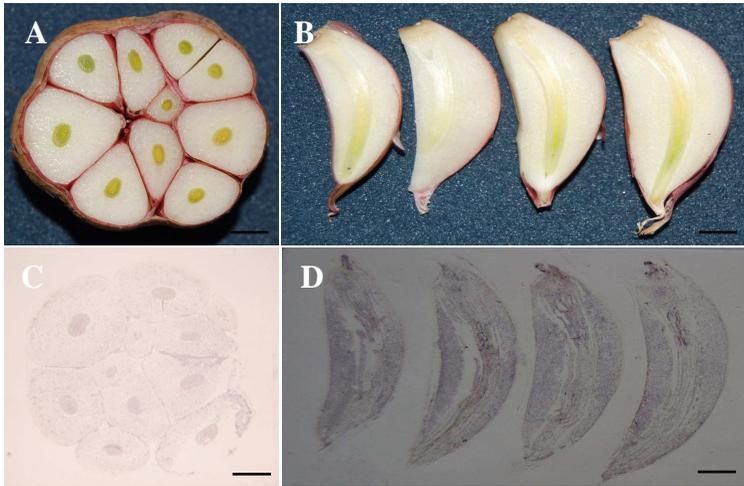


Figura 1. Teste imunoenzimático *tissue printing* para detecção de vírus em bulbilhos de alho da cultivar “Jonas”. As Figuras 3A e 3D mostram reação positiva ao soro de OYDV em bulbos e bulbilhos, respectivamente. Barras: 1cm. Caçador, SC, 2011.

3.2. Estabelecimento de protocolo para criopreservação de alho

A sobrevivência de ápices caulinares nos tratamentos controles (-NL) variou de 72% a 100% entre as duas soluções de vitrificação testadas (Tabela 1). Quando os tratamentos de ambas as soluções foram expostos ao nitrogênio líquido (+NL), verificou-se uma queda significativa da sobrevivência, onde a maior taxa (68%) foi obtida com a exposição dos explantes por 180 minutos na solução PVS3. Nesta solução, nos tempos zero e 60 minutos, nenhum explante sobreviveu, ao passo que, na solução PVS2 só não houve sobrevivência de explantes no tempo zero.

Tabela 1. Taxa de sobrevivência de ápices caulinares de alho cultivar “Jonas”, tratados em soluções de vitrificação PVS2 e PVS3 por diferentes períodos, e criopreservados ou não em nitrogênio líquido. Florianópolis, SC (CCA/UFSC), 2010.

Tratamentos (duração em minutos)	Sobrevivência (%)			
	PVS3		PVS2	
	+NL	-NL	+NL	-NL
0	0 B c	96 A a	0 B b	100 A a
60	0 B c	100 A a	24 B ab	96 A a
120	36 B b	100 A a	40 B a	76 A a
180	68 A a	84 A a	32 B ab	88 A a
240	60 B ab	100 A a	20 B b	72 A a

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas e maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. + NL: tratamentos criopreservados em nitrogênio líquido; - NL: controle.

Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores que tratam do uso de protocolos de vitrificação para criopreservação de alho, sobretudo no que se refere às performances atingidas com o uso da solução PVS3. No primeiro trabalho publicado sobre criopreservação de alho por Niwata (1995), fragmentos basais de bulbilhos pós-dormentes tratados pelo método de vitrificação utilizando crioprotetores PVS2 (Sakai et al., 1990) foram congelados e resultaram numa porcentagem de rebrota dos explantes próxima de 70%. Hannan & Garoutte (1996) repetiram essa abordagem experimentando uma fase de pré-condicionamento, obtendo resultados semelhantes. Entretanto, em ambos os trabalhos, os autores enfatizam sérios problemas causados por infecção latente dos explantes de origem, contabilizando taxas finais de sobrevivência inferiores a 50%.

Ao contrário dos trabalhos publicados por Niwata (1995) e Hannan & Garoutte (1996), Keller (2002) obteve resultados superiores utilizando solução de vitrificação PVS3 em meio de cultura líquido. Esta solução crioprotetora não contém DMSO, ao qual foram atribuídos efeitos tóxicos em diferentes explantes do bulbilho de alho, observados por Keller (2002) e por Ellis et al. (2006). No presente trabalho, é provável que as menores taxas de sobrevivência observadas entre os tratamentos com a solução PVS2, submetidos ou não ao congelamento, também foram devidas aos efeitos tóxicos causados pelo DMSO.

Embora os incentivos para o desenvolvimento de métodos de criopreservação sejam importantes para a preservação de espécies, existem poucos laboratórios que utilizam estes métodos para preservação de espécies do gênero *Allium* em grande escala (Ellis et al., 2006). Para esses autores, na adoção dessas técnicas visando o emprego em bancos de germoplasma, alguns critérios devem ser observados: 1) um grande número de explantes viáveis devem ser preservados, 2) os explantes conservados devem ter um mínimo de viabilidade para assegurar a viabilidade durante o armazenamento a longo prazo e, 3) a técnica deve ser robusta o suficiente para trabalhar com muitos genótipos diferentes. No presente trabalho, a meta de um grande número de explantes criopreservados, a princípio, não foi o objetivo principal, porém, um valor considerável de viabilidade dos mesmos foi alcançado. Por se tratar de uma primeira experiência, do ponto de vista de conservação de germoplasma, os resultados aqui obtidos são expressivos.

Uma vez que um forte efeito genotípico e a influência do tamanho dos explantes sobre o potencial de rebrote após o congelamento já foram observados em trabalhos anteriores (Makowska et al., 1999; Keller, 2002; Ellis, 2006), sugere-se testar mais métodos para a criopreservação de acessos de alho, visto que, no presente estudo, trabalhou-se com um único genótipo e uma única fonte de explante. Outras soluções de vitrificação poderiam ser experimentadas, tais como a solução PVS4 (Sakai, 1998), ou a solução desenvolvida por Langis (1989) que adiciona sorbitol e albumina soro bovino, ou a solução de Burrit (2012) que experimentou a adição do aminoácido prolina na solução PVS3, obtendo excelentes resultados. Outras técnicas de criopreservação, tais como encapsulamento e desidratação ou encapsulamento-vitrificação, que foram aplicados com sucesso a um grande número de espécies (Engelmann, 2004) também poderiam ser testadas em alho.

3.3. Crioterapia de ápices caulinares para remoção do complexo viral do alho

Em alho, a cultura de meristema é considerada um instrumento de referência para erradicação de vírus. Vários trabalhos, baseado na cultura de meristema apenas, ou em combinação com a termoterapia, relatam a erradicação de viroses. Estudos mostram que a crioterapia de ápices caulinares (Brison et al., 1997; Wang et al., 2003, 2008) ou aglomerados meristemáticos (Helliot et al., 2002) resultam em plantas

livres de vírus com uma maior frequência do que a cultura de meristema.

Entre os métodos de limpeza de vírus testados neste trabalho, a cultura de ápices caulinares proporcionou a maior taxa de sobrevivência, independente do período de avaliação, não sendo detectadas diferenças entre este método e a cultura de meristemas (Tabela 2). A crioterapia, associada ou não com a termoterapia, foi o método que apresentou as menores taxas de sobrevivência aos 30 dias após o descongelamento dos explantes. Com a associação dos dois métodos observou-se um incremento na frequência de eliminação de OYDV, GCLV e, principalmente, de LYSV, ausente em 100% das amostras sobreviventes. Por outro lado, a combinação da termoterapia com a cultura de meristemas promoveu uma frequência de eliminação de 83,3, 100 e 38,8% dos fitovírus OYDV, LYSV e GCLV, respectivamente. (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito da cultura de ápices caulinares, cultura de meristemas, termoterapia seguida de cultura de meristemas, crioterapia e termoterapia seguida de crioterapia na sobrevivência e na eliminação de complexo viral em plantas de alho cultivar Jonas. Florianópolis, SC (CCA/UFSC), 2010/2011.

Métodos de limpeza	Sobrevivência (%)		Plantas livres de vírus ³ (Nº / %)		
	2ª semana ¹	4ª semana ² (Nº / %)	OYDV	LYSV	GCLV
Cultura de ápices caulinares	96 a	23/92 a	6/26,1	8/34,7	3/13,0
Cultura de meristemas	80 ab	20/80 ab	8/40,0	12/60	4/20
Termoterapia + cultura meristemas	76 b	18/72 b	15/83,3	18/100	7/38,8
Crioterapia (PVS3)	72 bc	16/64 bc	14/87,5	15/93,8	10/62,5
Termoterapia + crioterapia (PVS3)	48 c	10/40 c	9/90	10/100	8/80

¹⁾ Avaliada em função de evidências de esverdeamento e inchaço dos explantes.

²⁾ Avaliado por contagem do número de ápices que produziram folhas novas.

³⁾ Amostras indexadas por Dot-blot e RT-PCR.

Notadamente, os efeitos benéficos da termoterapia foram mais evidentes quando foi associada à cultura de meristemas, onde se obteve maiores incrementos de plantas livres das três espécies de vírus (Tabela 2). Isto levanta a questão sobre o mecanismo pelo qual a erradicação de vírus pode ser potencializada pela termoterapia. Há indicações de que a termoterapia inibe a replicação viral enquanto a degradação continua,

resultando em posterior eliminação do vírus a partir de ápices caulinares em pleno desenvolvimento (Kassanis, 1957; Cooper e Walkey, 1978). Coerente com esse modelo, a termoterapia não foi eficaz quando aplicada sobre tecidos dormentes infectados com vírus (Cooper & Walkey, 1978). A partir dessas observações, o mecanismo de eliminação de vírus em plantas a partir da termoterapia ganhou menos atenção (Bhojwani e Razdan, 1996).

Diversos estudos têm comprovado a degradação de RNA viral em células de folhas e ápices de partes aéreas de várias espécies em ativo crescimento durante a termoterapia, como em framboesa (*Rubus idaeus*) (Wang et al., 2008). De acordo com Wang et al. (2008) resultados de estudos como estes podem ser reforçados pela teoria do silenciamento de RNA, um mecanismo celular dedicado à orientação da degradação do RNA viral em plantas. A partir de estudos sobre o transporte seletivo de RNAs em plantas, Foster et al. (2002) propuseram um mecanismo de vigilância que regula a sinalização e protege o ápice da parte aérea a partir da invasão viral, em particular, as células que dão origem a estruturas reprodutivas. Geralmente isto tem sido constatado sob temperaturas elevadas e variadas, de 15 a 27°C (Szittyta et al., 2003), 21 ou 27°C (Qu et al., 2005) e 25 a 30°C (Chellappan et al., 2005). Verifica-se um consenso entre os autores de que a atuação do mecanismo de silenciamento de RNA viral foi significativamente maior sob as temperaturas mais altas.

O silenciamento de RNA também tem sido relacionado com a exclusão de vírus a partir de meristemas caulinares (Foster et al., 2002; Mochizuki e Ohki, 2004; Schwach et al., 2005). Recentemente, Wang et al. (2008) isolaram pequenos RNAs de interferência a partir de meristemas caulinares de *R. idaeus*, e não descartaram o mecanismo de silenciamento como uma das causas da degradação de vírus verificada durante a termoterapia.

No presente trabalho, a termoterapia aplicada aos ápices caulinares de alho foi realizada sob temperatura constante de 38°C. Esta temperatura ainda é fisiologicamente adequada para o crescimento do alho, portanto, não se pode descartar que tais condições permitissem eficiente eliminação do RNA-OYDV pelo mecanismo de silenciamento.

Na Figura 2, é possível observar as reações ao antissoro OYDV, detectadas pelo teste imunoenzimático Dot-blot, em amostras de plantas obtidas por alguns dos métodos de limpeza de vírus testados. As análises de RT-PCR confirmou os resultados do teste imunoenzimático em 100% das amostras testadas para OYDV e LYSV, e em 62,5% das

amostras testadas para GCLV (Tabela 3 e Figura 3). Isto sugere cautela ao interpretar resultados de diagnose, sobretudo quando se trata de testes imunoenzimáticos que, apesar de amplamente utilizados para indexagem de vírus em diversas espécies, podem induzir a erros de interpretação.

Além dos vírus que formam o complexo mosaico do alho, também foram testadas no presente trabalho outras três espécies de vírus por RT-PCR: GarV-C, GarV-D e GarMbFV (Tabela 3). Essas espécies foram identificadas por Fayad André (2010), como ocorrentes na região produtora de alho nobre do Rio Grande do Sul, embora não tenham sido detectadas em nenhuma das amostras testadas neste trabalho.

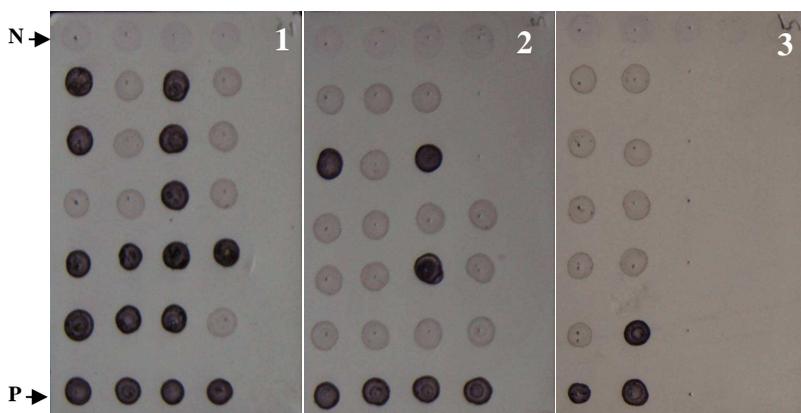


Figura 2. Detecção de *onion yellow dwarf virus* (OYDV) por Dot-Elisa, em plantas de alho cultivar Jonas regeneradas *in vitro*, através dos métodos: (1) cultura de meristemas (20 amostras), (2) termoterapia seguida de cultura de meristema (18 amostras), e (3) termoterapia seguida de crioterapia (10 amostras). As letra 'N' e 'P' correspondem as linhas com as reações dos controles negativo e positivo, respectivamente. Caçador, SC, 2011.

As plantas sobreviventes aos métodos de limpeza de viroses avaliados no presente trabalho, foram inicialmente identificadas aos 15 dias por evidências de inchaço e presença de coloração verde nos explantes, e aos 30 dias pela emissão de novas folhas. Na Figura 4, são apresentadas, em fases distintas, imagens de explantes sobreviventes ao tratamento de crioterapia em solução PVS3.

Tabela 3 . Detecção de seis espécies de vírus em alho cultivar Jonas por RT-PCR, em amostras submetidas a diferentes processos de limpeza de vírus. 1: crioterapia; 2: cultura de ápices caulinares; 3: termoterapia seguida de cultura de meristemas; 4 e 5 : cultura de meristemas; 6, 7 e 8: termoterapia seguida de crioterapia. Brasília, DF (UnB), 2011.

Espécies virais	Amostras com resultado negativo							
	1	2	3	4	5	6	7	8
OYDV	3/3	0/3	2/3	1/3	1/3	3/3	1/3	0/3
LYSV	3/3	1/3	3/3	2/3	2/3	3/3	3/3	3/3
GCLV	3/3	0/3	2/3	1/3	1/3	1/3	2/3	2/3
GarV-C	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3
GarV-D	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
GarMbFV	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3

* Os resultados relativos á espécie GCLV estão indicados no gel da Figura 3.

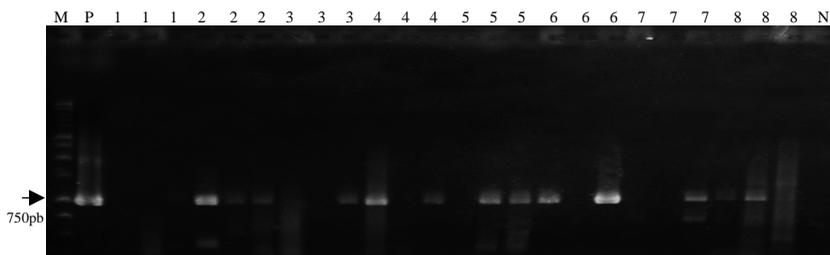


Figura 3 – Detecção de *garlic common latent vírus*, (GCLV) por RT-PCR, em amostras de três de plantas de alho cultivar Jonas obtidas de cada método de regeneração utilizado. 1: crioterapia; 2: cultura de ápices caulinares; 3: termoterapia seguida de cultura de meristema, 4 e 5: cultura de meristema; 6, 7 e 8: termoterapia seguida de crioterapia. M: marcador; N: controle negativo. P: controle positivo. Brasília, DF (UnB), 2011.

Estudos histológicos: existem poucas informações sobre o mecanismo pelo qual a crioterapia potencializa a erradicação de vírus a partir de ápices caulinares de plantas. Nesse contexto, o desenvolvimento ou aprimoramento de um protocolo deve, obrigatoriamente, passar pelo entendimento do modo de ação da criopreservação. No presente trabalho, observações na estrutura e

ultraestrutura de meristemas caulinares criopreservados foram realizadas e comparadas com um controle (Figura 5).

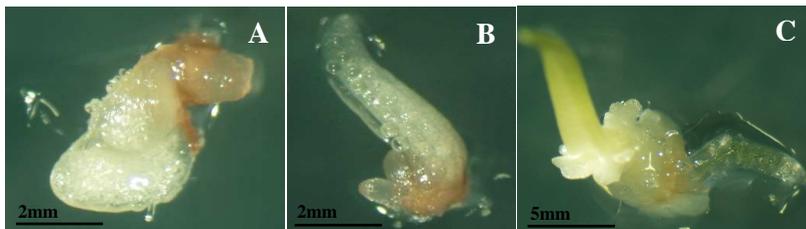


Figura 4. Ápices caulinares de alho cultivar Jonas submetidos ao tratamento em solução de vitrificação PVS3 e criopreservados em nitrogênio líquido, aos 15 dias (A), aos 30 dias (B) e aos 40 dias (C), após o descongelamento. Florianópolis, SC (CCA/UFSC), 2011.

Uma característica marcante observada em células situadas na cúpula de meristemas caulinares de alho (células troncos) foi o pequeno tamanho e a alta razão nucleo-citoplasma que, tal como relatado por Helliot et al. (2002) para *Musa spp*, diminui progressivamente na medida em que se afasta em direção a região do procâmbio. Nessas células, observadas também em imagem de microscopia eletrônica de transmissão (Figura 5D), os nucléolos apresentam-se distintos e arredondados no núcleo localizado num citoplasma denso, contendo vários vacúolos pequenos e um grande número de organelas (proplastídeos e mitocôndrias), típico de um metabolismo celular altamente ativo.

Cinco dias após o criotratamento, anomalias em vários graus foram observadas nos explantes. A localização das células danificadas indica que as lesões causadas pelo congelamento podem estar ligadas ao aumento da vacuolização nas células, ocorrido após a termoterapia (Figura 5E), que também se apresentaram levemente plasmolisadas (Figura 5B, região demarcada com círculo).

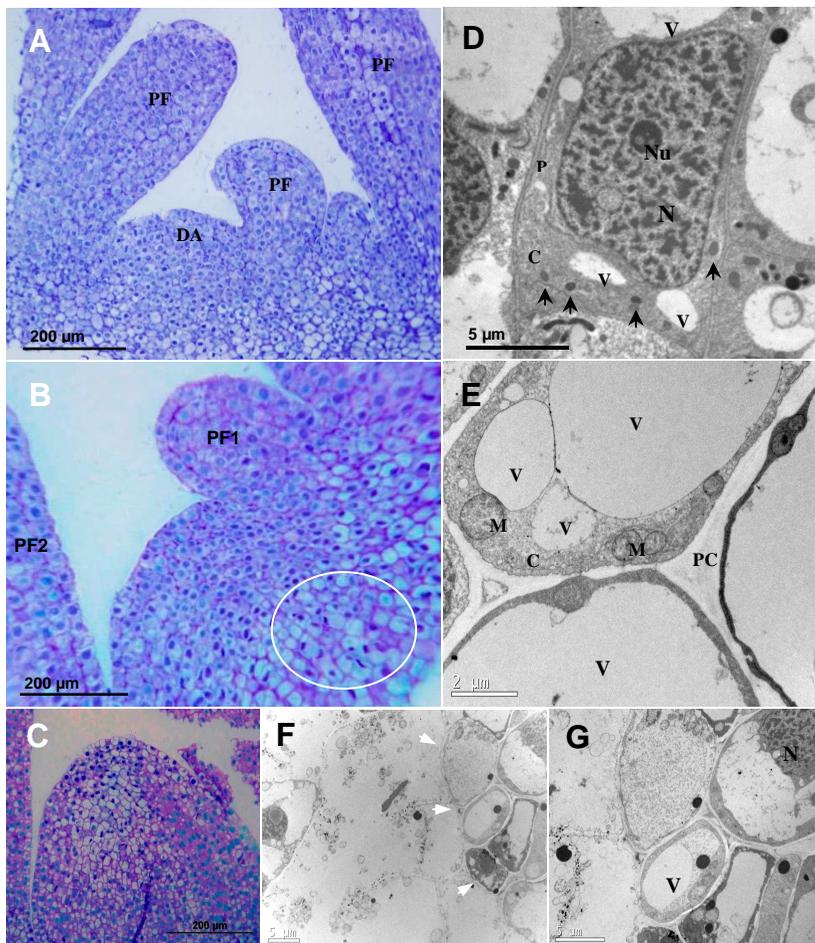


Figura 5. Alterações celulares em ápices caulinares de alho cv. 'Jonas' associadas a crioterapia. **A-C:** secções longitudinais de ápices caulinares de alho corados com azul de toluidina e observados em microscopia de luz. **A:** ápice caulinar não criopreservado; **B:** ápice caulinar 30 dias após termoterapia com evidência de plasmólise; **C:** ápice caulinar 5 dias após o criotratamento em solução PVS3, com algumas células na parte superior do meristema com núcleos preservados. **D-F:** observações celulares em microscopia eletrônica de transmissão. **D:** célula característica das primeiras camadas do domo apical (controle). As setas pretas indicam a presença de mitocôndrias; **E:** células mais afastadas do domo apical, correspondente á região circulada na figura (b); **F-G:** células preservadas de tecido meristemático rodeadas por células colapsadas, 5 dias após o descongelamento. C: citoplasma; DA: domo apical; PC: parede celular; PF: primórdio foliar; M:

mitocôndria; N: núcleo, Nu: nucléolo; V: vacúolo Florianópolis, SC (CCB/UFSC), 2011.

Quando da definição do protocolo de criopreservação, nos ápices caulinares não tratados com solução crioprotetora (controles) e naqueles tratados por um período mais curto, a maioria das células apresentaram lesões graves e subsequente morte, causadas pelos efeitos do congelamento (Figura 6).

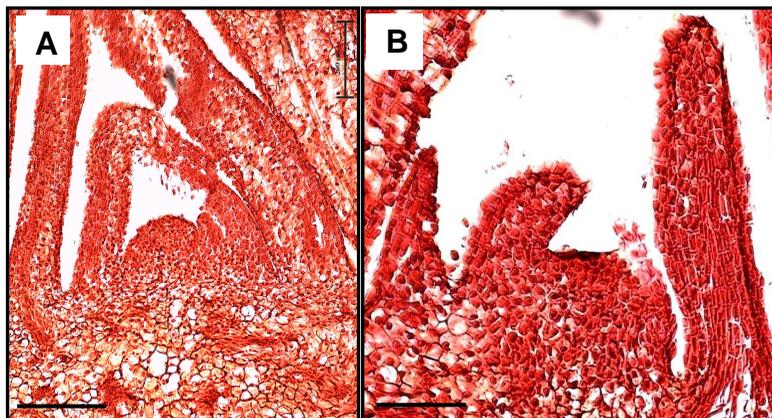


Figura 6. Secções longitudinais de ápices caulinares de alho cv. “Jonas” criopreservados, corados com safranina 0,5% e observados em microscopia de luz. Imagens de lesões severas causadas pelo congelamento nas células dos ápices caulinares não tratadas (A) e tratadas por 60 minutos em solução PVS3 (B). Barras: 200 μ m. Florianópolis, SC (CCB/UFSC) 2011.

As observações desse trabalho estão de acordo com os resultados de Helliot et al. (2002, 2003) que realizaram estudos histológicos em grupos de células meristemáticas de *Musa spp.* crio-tratadas e constataram que apenas as células localizadas no domo meristemático e na base dos primórdios foliares sobreviveram à crioterapia por vitrificação. Os mesmos autores presumiram que a crioterapia foi letal para as células mais desenvolvidas, infectadas pelo vírus, enquanto as células mais jovens sobreviventes encontravam-se, em sua maioria, não infectadas por *Cucumber mosaic virus* (CMV) e *Banana streak virus* (BSV).

A lesão por congelamento tem sido descrita, principalmente, como o resultado de cristalização de água intracelular, que ocorre quer seja durante o resfriamento e/ou nos passos seguintes do descongelamento.

De acordo com Hills & Nott (1999) vacúolos expandidos pode ser a consequência mais prejudicial de um tratamento térmico, quando associado a crioterapia, pois a água neles contida podem apresentar formas de cristais de gelo durante o congelamento, e os danos às membranas podem ser letais.

Amostras de tecidos do ápice caulinar de alho, observados em microscopia de luz (Figura 5C) e eletrônica (Figura 5F) cinco dias após o descongelamento, apresentaram uma estrutura compostas por uma organização de células aparentemente preservadas, rodeadas por algumas células fortemente colapsadas ou mortas, como pequenas ilhas de células sobreviventes identificadas na cúpula do ápice caulinar (Figuras 5C, 5F, 5G). Observou-se que estas pequenas áreas de células sobreviventes, também observadas por Helliot (1998) em ápices criopreservados de Ameixeira (*Prunus doméstica*), conservaram a sua organização estrutural e capacidade de divisão ativa, mantendo competência para conduzir à regeneração e o desenvolvimento de plantas inteiras de alho (Figura 7).

Apesar da constatação dos feitos benéficos da associação da termoterapia com a crioterapia, as imagens de microscopia mostram que a crioterapia atua como um micro-bisturi, também interpretado dessa maneira por Helliot (2002), ou seja, manteve viva algumas camadas de células meristemáticas, mas causou a morte de células parenquimáticas mais hidratadas e, provavelmente parasitadas por vírus do complexo mosaico do alho. Outras alterações morfológicas, tais como as observadas em membranas por Crowe et al. (1997), ou respostas fisiológicas devido ao estresse causado pelo calor, também podem ter reduzido a tolerância dessas células ao congelamento. Conseqüentemente, poucas células do domo apical e de primórdios foliares sobreviveram ao congelamento em nitrogênio líquido após a termoterapia.

Análise Imunocitoquímica: afim de conhecer a distribuição e a localização subcelular de *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) em ápices caulinares extraídos de bulbilhos de alho, vários ensaios foram executados para estabelecer um protocolo de imunolocalização desse fitovírus.

A imunolocalização de OYDV por imunogold revelou a presença do vírus em quase todas as partes do ápice caulinar, incluindo a porção distal do domo meristemático e os primórdios foliares (Figura 8). Geralmente, as células não-diferenciadas, localizadas nas primeiras camadas do meristema apical, não continham partículas detectáveis de

OYDV. Através da Figura 8E e 8F, é possível observar a presença de nanoesferas de ouro, no interior de células mais afastadas do domo meristemático, confirmando a presença de vírus nessa região do ápice caulinar, porém, sem um padrão de localização subcelular definido.

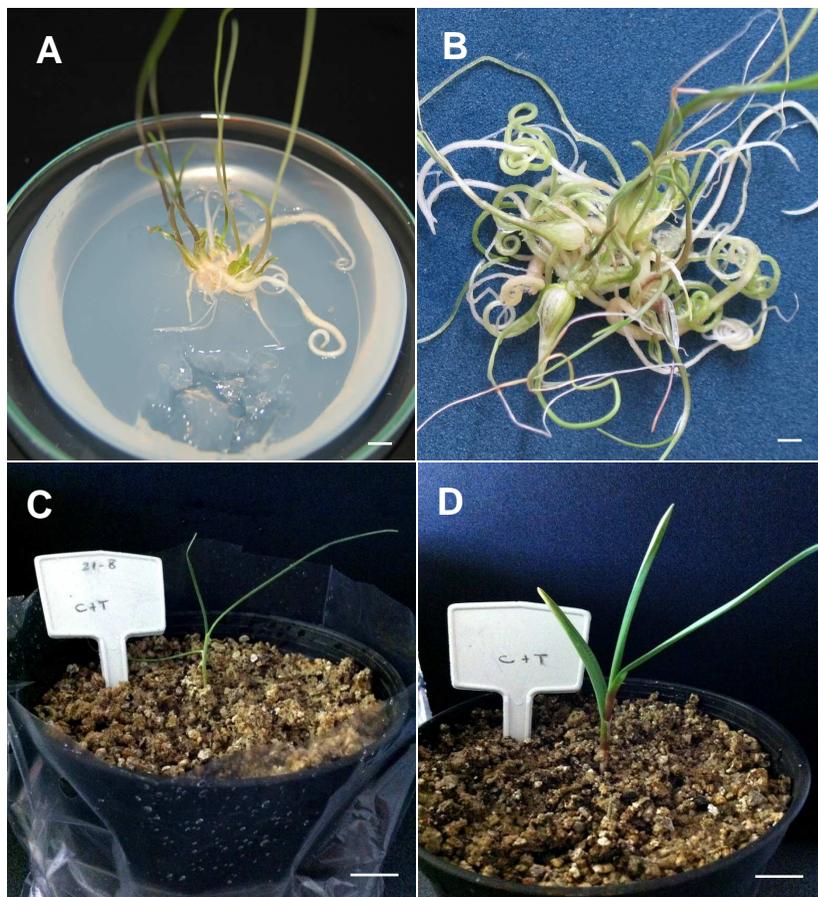


Figura 7 – Plantas de alho cv. “Jonas” regeneradas *in vitro* a partir de crioterapia de ápices caulinares, em vários estágios de crescimento. **A:** plantas em desenvolvimento *in vitro*, 80 dias após o criotratamento, **B:** microbulbos colhidos aos 120 dias após o criotratamento, **C:** planta livre de vírus, 30 dias após o plantio do microbulbo em vaso e, **D:** planta livre de vírus aos 55 dias após o plantio do microbulbo em vaso. Barras: A e B= 0,5cm, C e D= 1,0cm. Caçador, SC, 2010-2012.

Em células onde não foi detectada a presença de vírus, observou-se a formação de parede celular delgada, com presença de alguns plasmodesmos, aparentemente em formação (Figuras 8B e 8C), enquanto que, em células infectados com o vírus, no meristema e na base de primórdios foliares, plasmodesmos atravessando as paredes celulares foram mais frequentes e visíveis (Figura 8D).

A imunolocalização de OYDV em células de várias regiões do ápice caulinar do alho parece ter identificado um limite celular através do qual essa espécie de vírus ficou impossibilitado de se mover, algo semelhante a divisão de um embrião torpedo de *Arabidopsis* em subdomínios simplástico, determinados pelo transporte célula-célula através de plasmodesmos (Kim & Zambryski, 2005). Diferentes pesquisadores, entre eles: Lartey et al. (1997); Oparka et al. (1999) e Lucas (2006) defendem a hipótese que plasmodesmos regulam a comunicação entre as células e, é amplamente aceito que servem para a circulação de vírus célula-célula. Os padrões encontrados neste trabalho indicam que a distribuição de vírus em tecidos de ápices caulinares de alho pode estar associada com o desenvolvimento de plasmodesmos e sua capacidade de dar suporte a sua circulação.

Apoiado nessas observações sugere-se que *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) invade eficientemente ápices caulinares de alho, exceto as primeiras camadas de células do domo meristemático, demonstrado através da imunolocalização. A ausência de sinais de vírus verificada nessas células pode ser devido à entrada restrita do vírus, ao invés de entrada, replicação e posterior degradação do vírus pelo calor ou por outros mecanismos desconhecidos.

Para suportar este modelo, cabem duas hipóteses: a primeira, é sustentada por dados recentes que mostram que o sinal sistêmico de silenciamento, gerados em outros tecidos onde o silenciamento de RNA é ativado, não foi encontrado na região de células da cúpula de meristemas de *Arabidopsis* durante embriogênese (Kobayashi & Zambryski, 2007); e a segunda, diz respeito a restrição ao movimento de proteínas nesta região do meristema, em função da inexistência de elementos de vasos nesses tecidos, responsáveis pelo transporte de vírus a longa distância (Figura 8A), e pela mal formação de plasmodesmos responsável pelo movimento célula-célula de vírus, também verificado no presente estudo.

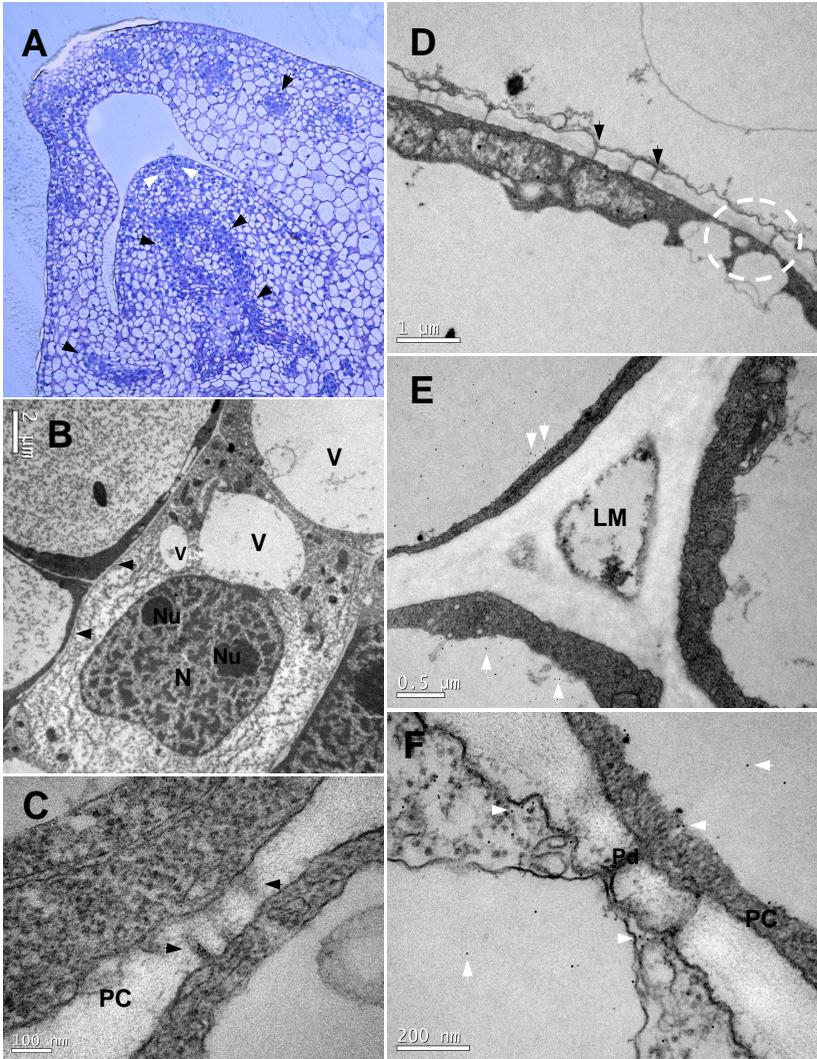


Figura 8. Detecção imunocitoquímica de *onion yellow dwarf virus* (OYDV) infectando células do ápice caulinar de alho cv. 'Jonas'. **A-** seção longitudinal do ápice caulinar corado com azul de toluidina, observado em microscopia de luz, indicando região de células do domo apical (setas brancas) e células diferenciadas (setas pretas) em região vascularizada; **B a F:** Observações em microscopia eletrônica de transmissão. **B-C:** célula típica do domo apical, com presença de parede celular delgada e plasmodesmos em formação (setas pretas);

D: célula diferenciada, típicas das regiões indicadas na figura 8-A, com forte presença de plasmodesmos atravessando a parede celular (setas pretas); **E-F:** imunoreatividade para OYDV revelada pela presença de nonoesferas de ouro coloidal (setas brancas). A região demarcada com círculo pontilhado na figura 8-D corresponde à região da célula mostrada na Figura 8-F; LM: lamela média; N: núcleo, Nu: nucléolo; PC: parede celular; PD: plasmodesmo; V: vacúolo. Florianópolis, SC (CCB/UFSC), 2011.

4. Conclusões

As possibilidades de conservação de germoplasma de alho a partir do protocolo de criopreservação desenvolvido neste trabalho são elevadas. A técnica de criopreservação estabelecida foi aplicada com êxito como ferramenta para remoção do complexo viral mosaico do alho que, comparado ao tradicional método da cultura meristema, promoveu taxas mais elevadas de eliminação das espécies virais que compõem este complexo.

No presente trabalho, é sugerido um modelo no qual a termoterapia causou uma avançada degradação dos vírus do complexo mosaico do alho em ápices caulinares. Posteriormente, a crioterapia reduziu a dimensão desses ápices fortemente invadidos pelos vírus. Esses dois efeitos em conjunto resultaram em uma situação em que 40% dos ápices sobreviveram e foram capazes de regenerar 90%, 100% e 80% de plantas livres de OYDV, LYSV e GCLV, respectivamente. Constatou-se ainda, por meio do teste de imunodeteção, que *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) invade eficientemente ápices caulinares de alho, exceto as primeiras camadas de células da cúpula do meristema.

Os resultados desse trabalho demonstraram que além da maior taxa de regenerantes proporcionada, a crioterapia pode evitar as dificuldades envolvidas no método tradicional de limpeza, tais como: tempo dispensado, a excisão de meristemas muito pequenos para garantir a regeneração de plantas, o uso de equipamentos mais precisos e mão de obra qualificada.

Os métodos sorológico e molecular empregados neste trabalho foram eficazes para a diagnose dos vírus, podendo ser aplicados na rotina do laboratório visando a obtenção de garantias de qualidade fitossanitária das sementes livres de vírus produzidas, sobretudo, os métodos enzimáticos por serem de menor custo e de fácil execução.

5. Considerações finais

Nas últimas décadas pesquisadores do mundo inteiro, dedicados a pesquisa do alho, têm realizado estudos com objetivos diversos, com destaque para investigações que visam divulgar e promover os atributos terapêuticos dessa importante hortaliça cultivada e consumida em vários países. No contexto agrônomo, porém, as informações geradas pela pesquisa ainda estão aquém das demandas do setor produtivo, com uma baixa frequência de trabalhos voltados aos aspectos agrônômicos práticos dessa espécie. Atualmente, estudos de fatores ligados a qualidade fisiológica e fitossanitária do alho-semente com o objetivo de obter avanços no conhecimento científico, figuram entre os mais carentes de pesquisa.

As infecções sistêmicas de plantas de alho por complexos virais causam significativas perdas de produção nas lavouras. A forma de propagação vegetativa da cultura é um facilitador na transmissão de várias espécies de vírus ao longo dos ciclos de plantio. O alho-semente utilizado pela maioria dos produtores no Brasil está infectado por alguma espécie viral, devido à ausência de um programa de controle da sanidade do material de propagação, e, principalmente, de um sistema de produção eficaz. Esta limitação tem levado ao acúmulo da concentração viral nos cultivos sucessivos, causando uma redução de produtividade e qualidade em grandes proporções.

A cultura de meristemas para eliminação de viroses em plantas de alho é uma importante ferramenta da Cultura de Tecidos Vegetais, aplicada em vários países do mundo. Apesar da sua ampla utilização, os protocolos atuais apresentam deficiências quanto a qualidade fisiológica e fitossanitária da semente produzida, ligadas ao rendimento e à ineficácia para a erradicação de complexos virais, presentes de forma latente na maioria das cultivares de alho plantadas no Brasil. Nesse contexto, a presente pesquisa gerou informações que poderão contribuir para um melhor entendimento dos aspectos em questão, bem como, contribuir para melhoria do sistema produtivo.

Quanto aos fatores fisiológicos relacionados a formação do bulbo de alho, até então pouco conhecidos, o conjunto de resultados obtidos indicam que plantas de alho cultivadas *in vitro* também apresentam respostas morfo-genéticas para a diferenciação e desenvolvimento de bulbos do tipo termo-fotoperiódico dependente.

Observou-se neste trabalho que o processo de bulbificação *in vitro* do alho consiste de duas fases: a primeira fase com uma característica

morfogênica para o qual a condição climática, temperatura reduzida e fotoperíodo curto, seriam os indicadores. A segunda etapa é iniciada quando o índice de bulbificação atinge razão bulbar 0,5, e a partir desse momento a intensificação da formação do bulbo ocorre em correlação com o acúmulo de massa até o final do ciclo.

Com relação aos níveis endógenos de AST e ABA encontrados em plantas de alho cultivadas *in vitro*, apesar de evidências apresentadas, acredita-se que não há ainda suporte suficiente para afirmar com clareza que o ácido abscísico, sob a influência do fotoperíodo, estaria afetando negativamente o processo de bulbificação em plantas de alho cultivadas *in vitro*, visto que, não se tem ainda um estudo detalhado da histogênese da bulbificação para suportar esta hipótese.

Estudos realizados nos últimos 20 anos resultaram no desenvolvimento de protocolos de criopreservação de células e tecidos de uma grande variedade de espécies de plantas. Em muitos casos as técnicas de criopreservação avançaram o suficiente para vislumbrar seu uso imediato em larga escala, em bancos de germoplasma. Entretanto, alguns materiais vegetais ainda se mostram sensíveis ao congelamento, como é o caso de sementes recalcitrantes (Santos, 2000). A diversidade de resposta entre as diferentes espécies de plantas, ou mesmo entre diferentes tecidos de uma mesma espécie, dificulta sobremaneira a generalização e o desenvolvimento de um protocolo de caráter universal (Ward, 2009).

As adaptações e otimizações realizadas neste trabalho permitiram a obtenção de um protocolo específico para criopreservação de alho, através de técnicas de vitrificação. As possibilidades de conservação do germoplasma de alho, a partir do protocolo desenvolvido, são elevadas, visto que, a taxa de sobrevivência de plantas obtida de até 68%, encontra-se dentro dos patamares aceitáveis na criopreservação.

Além do uso para conservação de germoplasma, identificou-se a criopreservação como uma ferramenta promissora para erradicar complexos virais em plantas de alho, e, possivelmente, outros agentes infecciosos, podendo ser proposta sua utilização como método eficaz na conservação de germoplasma de alho sadio e livre de vírus.

Contudo, a estabilidade do estado fitossanitário das plantas deverá ser comprovada nas gerações futuras, mantidas em telados protegidas de vetores. Da mesma forma, o efeito dos protocolos criogênicos e de regeneração sobre a estabilidade genética do material mantido em nitrogênio líquido precisa também ser averiguado.

Num contexto geral, este trabalho de tese foi fundamentado na necessidade de pesquisas para contribuir para a ampliação das perspectivas da utilização de tecnologias de limpeza de vírus, em favor do desenvolvimento da cultura do alho. Considera-se que as informações obtidas representam um avanço no conhecimento dessa espécie, e os resultados devem contribuir para a escassa informação disponível dos temas aqui abordados, podendo servir de referência para pesquisas futuras.

Dessa forma, os resultados, avanços e aplicações a serem obtidos a partir dessa pesquisa estão associados aos seguintes tópicos: conhecimento dos aspectos morfogênicos de importância na origem e no desenvolvimento de bulbos de cultivares de alhos; conhecimento dos fatores que afetam o processo de diferenciação e formação de bulbos em sistemas de cultivo *in vitro*; a regeneração das cultivares de alho-semente nobre permitirá a expressão do verdadeiro potencial produtivo das mesmas.

É oportuno mencionar ainda que, por serem materiais com maior capacidade produtiva, estudos de degenerescência de plantas livres de vírus a campo deverão ser propostos. A obtenção de novos coeficientes técnicos ajustados a tecnologia de produção permitirá uma revisão nas normas técnicas de produção para a cultura do alho. Além disso, materiais potenciais que apresentarem respostas agronômicas satisfatórias serão difundidos entre os produtores, preferencialmente os das principais regiões produtoras.

6. Referências bibliográficas

BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*, a Revised Edition. Amsterdam: **Elsevier Science BV**. 1996.

BRISON, M; BOUCAUD, M-T; PIERRONNET, A; DOSBA, F. Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv. *Prunus* rootstock experimentally contaminated with Plum Pox Potyvirus. **Plant Science**, v.123, p.189–196. 1997.

BURRIT, D.J. **Proline and the Cryopreservation of Plant Tissues: Functions and Practical applications**. In: *Current Frontiers in Cryopreservation*. Igor Katkov (ed). 2012.

CHELLAPPAN, P.; VANITHARANI, R.; OGBE, F.; FAUQUET, C.M. Effect of temperature on geminivirus-induced RNA silencing in plants. **Plant Physiology**, v.138, p. 1828–1841. 2005.

CONCI, V.C.; NOME, S.F.; MILME, R.G. Filamentous viruses of garlic in Argentina. **Plant Disease**, St. Paul, v. 76, n.6, p.594-596. 1992.

COOPER, V.C.; WALKEY, D.G.A. Thermal inactivation of cherry leaf roll virus in tissue cultures of *Nicotiana rustica* raised from seeds and meristem tips. **Ann. Appl. Biol.** 88, 273–278. 1978.

CROWE, J.H.; OLIVER, A.E.; HOEKSTRA, F.A.; CROWE, L.M. Stabilization of dry membranes by mixtures of hydroxyethyl starch and glucose: the role of vitrification. **Cryobiology**, v.35, p. 20-30. 1997.

ELLIS, D. SKOGERBOEL, D.; ANDRE, C.; HELLIER, B.; GAYLE, V. Cryopreservation of 12 *Allium sativum* (garlic) accessions: a comparison of plant vitrification solutions (pvs2) and pvs3. **In Vitro Cellular and Developmental Biology**, v.7, p. 11-12. 2005.

ELLIS, D. SKOGERBOEL, D.; ANDRE, C.; HELLIER, B.; GAYLE, V. Implementation of garlic cryopreservation techniques in the national plant germplasm system. *CryoLetters* 27(2), 99-106. 2006.

ENGELMANN, F. Plant Cryopreservation: Progress and prospects. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, v.40, p. 427–433. (2004).

FACCIOLI, G.; MARANI, F. Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. In: HADIDI, A.; KHETARPAL, R.F.; KOGANEZAWA, H. (eds) **Plant virus diseases control**. APS Press, St Paul, Minn. p. 346–380. 1998.

FAJARDO, T.V.M.; TORRES, A.C.; BUSO, J.A.; ÁVILA, A.C.; RESENDE, R.O. Produção e qualidade de bulbos de alho livre de suas principais viroses. **Summa Phytopathologica**, v.28, p.207-210. 2002.

FAYAD-ANDRÉ, M. S. **Diagnose, disseminação e efeitos fisiológicos do complexo viral do alho em regiões produtoras do Brasil**. Brasília: Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, 2010, 137 p. Tese de Doutorado.

FOSTER, T.M.; LOUGH, T.J.; EMERSON, S.J.; LEE, R.H.; BOWMANN, J.L.; FORSTER, R.L.S.; LUCAS, W.J. A surveillance system regulates selective entry of RNA into the shoot apex. **Plant Cell**, v.14, p. 1497–1508. 2002.

GAMA, M.I.C.S.; ÁVILA, A.C. Detecção de vírus em alho por látex sensibilizado e microscopia eletrônica imuno específica. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v.13, n.1, p.66-69. (1998).

GHINI, R.; BETTIOL, W. Controle físico, In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agrônômica Ceres, 3ed., p.786-803. 1995.

GURR, E. **The Rational Use of Dyes in Biology and General Staining Methods**. London, UK: Leonard Hill. (1965).

HANNAN, R.; GAROUTTE, D. **Proceedings of the 1995 National Onion Research Conference**, Madison: Wisconsin, p. 101-103. 1996.

HELGUERA, M.; BRAVO-ALMONACID, F.; KOBAYASHI, K.; RABINOWICZ, P. D.; CONCI, V. Immunological Detection of a GarV-

Type Virus in Argentine Garlic Cultivars. **Plant Disease**, v.81, p.1005-1010. 1997.

HELLIOT, B. **Croissance et Stabilité génétique des Vitroplants de Prunier Ferlenain Plumina (R) après cryoconservation des meristemes**. PhD thesis, Université de Bordeaux I, France. 1998.

HELLIOT, B.; SWENNEN, R.; POUMAY, Y.; FRISON, E.; LEPOIVRE, P.; PANIS, B. Ultrastructural changes associated with cryopreservation of banana (*Musa spp.*) highly proliferating meristems. **Plant Cell Reports**, v.21, p. 690–698. 2003.

HELLIOT, B.; PANIS, B.; POUMAY, Y.; SWENNEN, R.; LEPOIVRE, P.; FRISON, F. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa spp.*). **Plant Cell Reports**, v.20, p.1117–1122. 2002.

HILLS, B.P.; NOTT, K.P. NMR studies of water compartmentation in carrot parenchyma tissue during drying and freezing. **Applied Magnetic Resonance**, v.17, p.521-535. 1999.

JUNGHANS, T.G.; SOUZA, A.; KOBAYASHI, A.K. Cultura de tecidos em maracujazeiros. In: LIMA, A. de A.; CUNHA, M. A. P. da. **Maracujá: produção e qualidade na passicultura**. Cruz das Almas: Embrapa-Mandioca e Fruticultura, 2004. p.97-106.

KASSANIS, B. Effects of changing temperature on plant virus diseases. **Advances in Virus Research**, v.4, p. 221–241. (1957).

KELLER, J. **Cryopreservation of Plant Germplasm II**. (eds.) Towill and Bajaj, Springer-Verlag, Berlin, p. 37-47. 2002.

KIM, I.; ZAMBRYSKI, P.C. Cell-to-cell communication via plasmodesmata during Arabidopsis embryogenesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v.8, p. 593–599. 2005.

KOBAYASHI, K.; ZAMBRYSKI, P. RNA silencing and its cell-to-cell spread during Arabidopsis embryogenesis. **The Plant Journal**, v.50, p. 597- 604. 2007.

LANGIS, R.; SCHNABEL-PREIKSTAS, B.; EARLE, E.D.; STEPONKUS, P.L. **Cryo-Letters**, (10), 421-428. 1989.

LARTEY, R.; GHOSHROY, S.; HO, J.; Citovsky, V. Movement and subcellular localization of a tobamovirus in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v.12, p.537-545. 1997.

LIFSHITZ, R.; TABACHNIK, M.; KATAN, J.; CHET, I. The effect of sublethal heating on sclerotea of *Sclerotium rolfsii*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p.1607-16010. 1983.

LUCAS, W.J. Plant viral proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. **Virology**, v.344, p. 169–184. 2006.

MAKOWSKA, Z.; KEKKER, J.; ENGELMANN, F. Cryopreservation of apices isolated from garlic (*Allium sativum* L.) bulbils and cloves. **Cryo-Letters**, v. 20, 3ed, p.175-183. 1999.

MATTHEWS, R.E.F. Transmission, movement and host range. In: MATTHEWS, R.E.F. (ed) **Plant virology**, 3rd edn. Academic/Harcourt Brace Jovanovich, San Diego, p. 358–371. 1991.

MOCHIZUKI, T.; OHKI, S.T. Shoot meristem tissue of tobacco inoculated with Cucumber mosaic virus is infected with the virus and subsequently recovers from infection by RNA silencing. **Journal of General Plant Pathology**, v.70, p.363–366. 2004.

MOREL, G. Recherches sur la culture associée de parasites obligatoires et de tissus végétaux. **Ann Epiphyt**, v.1, p.123–234. 1948.

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

NIWATA, E. Cryopreservation of *Allium*. **Cryo-Letters**, v.16, p.102-107. 1995.

NYLAND, G.; GOHEEN, A.C. Heat therapy of virus diseases of perennial plants. **Annual Review Phytopathology**, v.7, p.331-354. 1969.

OPARKA, K.J.; ROBERTS, A.G.; BOEVINK, P.; SANTA CRUZ, S.; ROBERTS, I.; PRADEL, K.S.; IMLAU, A.; KOTLIZKY, G.; SAUER, N.; EPEL, B. Simple, but not branched, plasmodesmata allow the non-specific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. **Cell**, v.97, 743-754. 1999.

PARMESSUR, Y.; ALJANABI, S.; SAUNTALLY, S.; DOOKUNSAUNTALLY, A. Sugarcane yellow leaf virus and yellows phytoplasma: elimination by tissue culture. **Plant Pathology**, Oxford, v.51, p.561-566. 2002.

PEÑA-IGLESIAS, A. El ajo: virosis, fisiopatías y selección clonal e sanitaria: II parte científicoexperimental. **Boletim de Sanidad Vegetal**, Plagas, v.14, n.1, p.493-533. 1988.

QU, F.; YE, X.H.; HOU, G.C.; SATO, S.; CLEMENTE, T.E.; MORRIS, T.J. RDR6 has a broad-spectrum but temperature-dependent antiviral defense role in *Nicotiana benthamiana*. **Journal of Virology**, v.79, p. 15209-15217. 2005.

RAVNIKAR, M.; PLAPER, I.; UCMAN, R., ZEL, J. Establishmen of an efficient method for elimination in meristem cultures and regeneration of high quality plants. **Proceedings of IPBA**, Roglea, December v.5, n.7, p.97-102. 1994.

SAKAI, A. (1999) In: **Cryopresewation of Tropical Plant Gernzplasm - Current Research Progress and Applications**. Proceedings of JIRCAS/IPGRI Joint International Workshop, p.20-23. 1998.

SAKAI, A; KOBAYASHI, S; OIYAMA, I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Obs. var. *Brasiliensis tanaka*) by vitrification. **Plant Cell Reports**, v.9, p.30-33. 1990.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação: Potencial e perspectivas para conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12 (ed. esp.), p.70-84. 2000.

SCHWACH, F.; VAISTIJ, F.E.; JONES, L.; BAULCOMBE, D.C. An RNAdependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato

virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. **Plant Physiol.** v138, n. 1842–1852. 2005.

STOTT, D.I. Immunoblotting and dot blotting. **Journal Immunological Methods**, v.119, p.153-187. 1989.

SZITTYA, G.; SILHAVY, D.; MOLNAR, A.; HAVELDA, Z.; LOVAS, A.; LAKATOS, L.; BANFALVI, Z.; BURGYN, J. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. **The Embo Journal**, v.22, p. 633–640. 2003.

TORRES, A.C.; FAJARDO, T.V.M.; DUSI, A.N.; RESENDE, R.O.; BUSO, J.A. Shoot tip culture and thermotherapy for recovering virus-free plants of garlic. **Horticultura Brasileira: Brasília, DF**, v. 18, n.3, p.192-195. 2000.

TORRES, A.C.; TEIXEIRA, S. L.; POZZER, L. Cultura de ápices caulinares e recuperação de plantas livres de vírus. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA – CNPH, CBAB, 1998. v.1 p.133-145.

WALKEY, D.G.A.; WEBB, M.J.W.; BOLLAND, C.J.; MILLER, A. Production of virus-free garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*A. Ascalonicum* L.) by meristem-tip culture. **Journal of Horticultural Science**, v.62, n.2, p.211-221. 1987.

WANG, Q.; CUELLAR, W. J.; RAJAMÄKI, M.; HIRATA, Y.; VALKONEN, J. P. T. Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. **Molecular Plant Pathology**, v.9, n. 2, p. 237–250. 2008.

WANG, Q.; MUNIR, M; Li, P.; GAFNY, R.; SELA, I.; TANNE, E. Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. **Plant Science**, v.165, p.321–327. 2003.

WANG, Q.; VALKONEN, J. P. T. Efficient elimination of sweetpotato little leaf phytoplasma from sweetpotato by cryotherapy of shoot tips. **Plant Pathology**, v.57, p.338–347. (2008).

WARD, L.I. A survey of viral diseases of *Allium* crops in New Zealand. **Australasian plant pathology APP**, v. 38, n.5, p. 533-539. 2009.

WENT, G.Y.; MATO, A.; WISNIEWSKI, H.M.; MALIK, M.N.; JENKINS, E.C.; SHEIKH, A.M.; KIM, K.S. Light and electron microscopic immunocytochemical localization of two major proteins in garlic bulb. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.58, p.481-489. 1995.