



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CAMPUS II – AREIA-PB

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CURSO DE AGRONOMIA

ELISANDRA DA SILVA SOUSA

**INDUÇÃO DE PLANTAS HAPLÓIDES *IN VITRO* DE *Allium cepa* L. A PARTIR DE
OVÁRIOS NÃO FERTILIZADOS**

AREIA

2021

ELISANDRA DA SILVA SOUSA

**INDUÇÃO DE PLANTAS HAPLÓIDES *IN VITRO* DE *Allium cepa* L. A PARTIR DE
OVÁRIOS NÃO FERTILIZADOS**

Trabalho de Graduação apresentado à Coordenação do Curso de Agronomia, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Engenheira Agrônoma.

Orientador: Prof. Dr. Mailson Monteiro do Rêgo

Coorientadora: Profa. Dra. Elizanilda Ramalho do Rêgo

AREIA

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S725i Sousa, Elisandra da Silva.

Indução de plantas haplóides in vitro de *Allium cepa* L.
a partir de ovários não fertilizados / Elisandra da
Silva Sousa. - Areia:UFPB/CCA, 2021.
30 f. : il.

Orientação: Mailson Monteiro do Rêgo.

Coorientação: Elizanilda Ramalho do Rêgo.

TCC (Graduação) - UFPB/CCA.

1. Agronomia. 2. Cebola. 3. Ginogênese. 4. Híbridos. I.
Rêgo, Mailson Monteiro do. II. Rêgo, Elizanilda Ramalho
do. III. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 631/635(02)

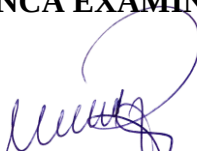
ELISANDRA DA SILVA SOUSA

**INDUÇÃO DE PLANTAS HAPLÓIDES *IN VITRO* DE *Allium cepa* L. A PARTIR DE
OVÁRIOS NÃO FERTILIZADOS**

Trabalho de Graduação apresentado à Coordenação do
Curso de Agronomia, do Centro de Ciências Agrárias, da
Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às
exigências para a obtenção do título de Engenheira
Agrônoma.

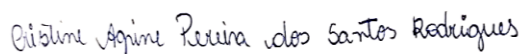
Aprovado em: 03/03/2021.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Mailson Monteiro do Rêgo (Orientador)

Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Me. Cristine Agrine Pereira dos Santos Rodrigues

Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Me. Kaline da Silva Nascimento

Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

**“Não deixe de sorrir.
Não deixe de dançar.
Essa é uma boa reza.”**

Vanessa da Mata

Ao meu amado e querido pai (in memoriam), por sempre ter apoiado os meus sonhos, sendo meu maior incentivador desde o início. Sempre se manteve presente em minha vida, antes fisicamente e agora espiritualmente. És minha luz!

“Obrigado por teu riso, eu sorri junto a você, me ensinastes a alegria e voastes para viver (...) obrigado pelas rosas, pela paz do teu olhar”.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Deus, a Ti agradeço por tudo, mas, principalmente, pelo dom da vida. Agradeço pelas pessoas que o Senhor colocou em meu caminho, estas foram e são minha fonte diária de amor, carinho, respeito, amizade, aprendizado, força e perseverança. Agradeço também por nunca ter desistido de mim, pois nos dias mais difíceis, quando me faltaram forças e até mesmo fé, o Senhor não me deixou cair, me mostrou o caminho certo a seguir e me mostrou que sou capaz.

Aos meus pais, Edglê (*in memoriam*) e Sônia, por desde sempre terem sido minha fonte maior de incentivo e inspiração, e por todo apoio prestado nos meus estudos. Nenhuma palavra é capaz de expressar o tamanho da gratidão que sinto por vocês. Muito obrigada por tudo! Eu sou o que sou, graças a vocês!

Ao meu avô, Manoel José (Seu Machadinho), por sempre ter confiado em mim e por sempre apoiar os meus “voos”, não imagina o quanto é gratificante para mim ser sua neta! Agradeço também a minha vó Socorro, que chamo carinhosamente por mãe, por juntamente com meu avô Manoel, terem prestado apoio a mim, a mainha e a minha irmã em um momento tão difícil. Amo vocês.

À minha irmã, Érika, e aos meus tios Sérgio, Suely, Jackson e Jaíra, que não mediram esforços e me ajudaram durante esse ciclo. Muito obrigada, vocês são muito especiais para mim.

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB), em especial ao Centro de Ciências Agrárias (CCA), por ter me proporcionado a oportunidade de realizar este grande sonho. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas concedidas para a realização de pesquisas científicas.

Ao professor Mailson Monteiro do Rêgo, pela orientação, pelas oportunidades, paciência, ensinamentos e apoio, prestados durante meu percurso no Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal (LBMV), sou muito grata.

À Kaline Nascimento, por ter me recebido tão bem, por ter me ensinado tanto sobre a cultura de tecidos vegetais, por ter sido um ombro amigo e por ter me estendido a mão quando precisei, pelas palavras de conforto, pelos sorrisos, abraços, puxões de orelha e diversos momentos compartilhados, por tudo, muito obrigada.

Ao coordenador do curso, professor Bruno de Oliveira Dias, pela assistência prestada sempre que precisei, pelas conversas, pelo incentivo e pela confiança.

À Tatiana e Jaime, que se mantiveram presentes durante minha graduação, e sempre me incentivaram na vida acadêmica. São minha fonte constante de motivação e incentivo. Sou eternamente grata pela orientação, pelas oportunidades, pela amizade, pelos sorrisos, abraços, choros e aventuras. São parte da minha família!

Aos amigos que deixei em Sousa, e mesmo com minha ausência nunca me abandonaram, Kátia, Karine, Camila, Mylene, Mayara e Rosinaldo, amo vocês!

Às amigadas que construí durante a graduação, Denis, Eloyza, Inara, Jardel, João Paulo, Nardiele, Vitória, Welisson e Williams, os quais sempre estiveram comigo desde o início, nos dias de sol e de chuva, compartilhando sonhos, sorrisos, abraços, carinho e muito amor. Muito obrigada por terem me dado colo, conselhos, e por terem sido meu lar. Sou eternamente grata pela amizade, amo muito vocês.

A todos os colegas e amigos que fiz durante meu percurso pelo CCA, em especial aos das turmas 2015.1 (Felipe, Letícia, Priscila, Daniele, Mariana, Paulo, Maurício, João Victor, Bruninho e Victor), 2016.1 (Kaio, Hélder, Alex, Leon, Juninho, Fioretti, Juscelino, Francisco de Assis, Clayton, Lilian, Walber, Hinkley e Thaysa) e da turma 2016.2 (Edmilson, Laura, Jaqueline, Robson, Jéssica, João Paulo, Erasmo, Fernando e Vinícius) do curso de Agronomia da UFPB.

À Michelle, Rubens, Kaline, Karla e Felipe, por terem sempre se preocupado comigo, me aconselhado, e por terem prestado apoio, ajuda e colo quando mais precisei, vocês fizeram os dias tempestuosos serem mais leves. Muito obrigada por tudo, amo vocês!

Aos amigos e colegas que fiz no LBMV, Ângela, Cristine, Ayron, Karla, Witalo, Júnior, Joabe, Geovana, Matheus, Gabriela, Lindamara, Joálisson, Eliane, Jardel e Kadson, que tive o prazer de conhecer, trocar experiências de vida e da academia, compartilhar sorrisos e sonhos, obrigada!

Aos funcionários do CCA, em especial a Seu Jacy, Bizeca, Seu Bachó, Seu Jajá, Seu Vavá, Naú, Ronaldo, Assis e Evilásio, pelas conversas e sorrisos trocados, por muitas vezes foram meu amparo nos dias de tristeza e dor.

Meu muito obrigada!

RESUMO

A produção de híbridos é considerada um dos principais objetivos dos programas de melhoramento de cebola. No entanto, o tempo necessário para se produzir híbridos a partir de linhagens endogâmicas por métodos convencionais é um fator limitante. Uma forma de superar esse problema, de forma eficiente, tem sido realizado através da técnica de duplo-haplóides (DH). Os embriões haplóides regenerados por ginogênese, são convertidos em plantas duplo-haplóides, e posteriormente, são cruzadas para produção de híbridos. Assim, objetivou-se induzir a formação de plantas haplóides *in vitro* de *Allium cepa* L. a partir ovários não-fertilizados. Inicialmente, ovários não-fertilizados da cultivar IPA-12 foram inoculados em meio de cultura BDS (Dunstan e Short, 1977), suplementado com 100 g.L⁻¹ de sacarose, 200 mg.L⁻¹ de prolina, 500 mg.L⁻¹ de mioinositol, 10 mg.L⁻¹ de sulfato de adenina e vitaminas B5, e sob diferentes combinações de reguladores de crescimento 2,4-D (0, 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹) e BAP (0, 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da adição de 6 g.L⁻¹ de ágar, em seguida, autoclavado por 15 minutos a 121°C. Foram inoculados 20 ovários não-fertilizados em cada placa de Petri, e os calos e embriões formados foram coletados e transferidos para meio MS meia força, suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de AIB + 1,0 mg.L⁻¹ de KIN. Após 3-4 semanas, as plântulas foram transferidas para substrato comercial PlantMax® para aclimatização. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3², os tratamentos consistiram na combinação de doses de 2,4-D e BAP, com 9 tratamentos e 25 repetições cada. As variáveis analisadas foram número de explantes que formaram calos; porcentagem de formação de calos (%); número de explantes que formaram embriões e porcentagem de formação de embriões (%). Os dados foram submetidos a análise de variância e quando houve diferenças significativas as médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. A produção de calos foi observada a partir da quarta semana da inoculação dos ovários. Ao todo foram formados 411 calos e 69 embriões, correspondendo a 22,83% e 5,4%, respectivamente. Maior número de plântulas haplóides foram obtidas em meio BDS livre de regulador de crescimento, enquanto a maior porcentagem de calos foi obtida quando o meio BDS foi suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 2,0 mg.L⁻¹ de BAP. O genótipo IPA-12 apresenta alta capacidade ginogênica, não sendo necessário o uso de reguladores de crescimento na indução de haplóides. O nível de ploidia será determinado por citometria de fluxo.

Palavras-Chave: Cebola. Ginogênese. Híbridos.

ABSTRACT

Hybrid production is considered one of the main objectives of onion breeding programs. However, the time required to produce hybrids from inbred lines by conventional methods is a limiting factor. One way to overcome this problem, efficiently, has been done using the double-haploid (DH) technique. The haploid embryos regenerated by gynogenesis, are converted into double-haploid plants, and later, are crossed to produce hybrids. Thus, the objective was to induce the formation of haploid plants in vitro of *Allium cepa* L. from unfertilized ovaries. Initially, unfertilized ovaries of the IPA-12 cultivar were inoculated in BDS culture medium (Dunstan and Short, 1977), supplemented with 100 g.L⁻¹ of sucrose, 200 mg.L⁻¹ of proline, 500 mg.L⁻¹ of myoinositol, 10 mg.L⁻¹ of adenine sulfate and vitamins B5, and under different combinations of growth regulators 2,4-D (0, 1,0 and 2,0 mg.L⁻¹) and BAP (0 , 1.0 and 2.0 mg.L⁻¹). The pH of the medium was adjusted to 5.8 before adding 6 g.L⁻¹ of agar, then autoclaved for 15 minutes at 121 ° C. Twenty unfertilized ovaries were inoculated into each Petri dish, and the calluses and embryos formed were collected and transferred to medium strength MS medium, supplemented with 1.0 mg.L⁻¹ of IBA + 1.0 mg.L⁻¹ of KIN. After 3-4 weeks, the seedlings were transferred to commercial PlantMax® substrate for acclimatization. The experiment was conducted in a completely randomized design, in a factorial scheme 32, the treatments consisted of the combination of doses of 2,4-D and BAP, with 9 treatments and 25 repetitions each. The variables analyzed were the number of explants that formed calluses; percentage of callus formation (%); number of explants that formed embryos and percentage of embryo formation (%). The data were subjected to analysis of variance and when there were significant differences, the means were compared by the Tukey test at the level of 5% probability. Callus production was observed from the fourth week of ovary inoculation. Altogether 411 calli and 69 embryos were formed, corresponding to 22.83% and 5.4%, respectively. Higher number of haploid seedlings were obtained in BDS medium free of growth regulator, while the highest percentage of calluses was obtained when the BDS medium was supplemented with 1.0 mg.L⁻¹ of 2,4-D + 2.0 mg .L⁻¹ of BAP. The IPA-12 genotype has a high gynogenic capacity, and it is not necessary to use growth regulators to induce haploids. The ploidy level will be determined by flow cytometry.

Keywords: Onion. Gynogenesis. Hybrids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. A- Plantio de bulbos de cebola da cultivar IPA-12. B- Plantas de cebola cultivar IPA-12 em fase de florescimento.	19
Figura 2. A- Umbela no momento da colheita. B- Explantes (botões florais) utilizados no cultivo <i>in vitro</i> . (Barra: 1cm).....	20
Figura 3. A- botões florais inoculados em meio de cultura para indução de haplóides. B- Plântulas haplóides <i>in vitro</i> em meio de regeneração.	21
Figura 4. Diferentes estágios de desenvolvimento de calos e embriões em cultivar de cebola (IPA-12). A- Ovário intumescido. B- Indução de calos. C- Indução de embrião.	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Total de formação de calos e embriões <i>in vitro</i> em cebola (<i>Allium cepa</i> L.).....	23
Tabela 2. Análise de variância da influência de diferentes concentrações de BAP e 2,4-D sobre a regeneração <i>in vitro</i> de calos e plântulas de <i>Allium cepa</i> L. via ginogênese.....	24
Tabela 3. Comparações de médias da interação entre as diferentes doses de BAP e 2,4-D sobre a regeneração de calos e plântulas de cebola (<i>Allium cepa</i> L.) pelo teste de Tukey ao nível de a 5% de probabilidade.....	24
Tabela 4. Porcentagem de calos e embriões de <i>Allium cepa</i> L. induzidos <i>in vitro</i> a partir de diferentes concentrações de 2,4-D e BAP.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
2,4-D	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
ANA	Ácido naftaleno acético
AIB	Ácido indolbutírico
BAP	6-benzilaminopurina
BDS	Meio de cultura formulado por Dunstan e Short (1977) a partir de B5 de Gamborg et al. (1968)
DH	Duplo-Haploide
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
g	Grama
h	Hora
ha	Hectare
IPA	Instituto de Pesquisa Agropecuária
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
KIN	Cinetina
L	Litro
mg	Miligrama
Nº	Número
NaClO	Hipoclorito de sódio
pH	Potencial Hidrogeniônico
t	Tonelada

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca Registrada
*	Multiplicação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	15
2.1 Geral	15
2.2 Específicos	15
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1 Classificação botânica.....	16
3.2 Importância econômica.....	16
3.3 Indução de haplóides em cebola.....	16
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Local do experimento	19
4.2 Material vegetal.....	19
4.3 Cultivo <i>in vitro</i>	20
4.4 Aclimatização das plântulas	21
4.5 Avaliações	21
4.6 Análise estatística	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
6 CONCLUSÃO	27
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28

1 INTRODUÇÃO

A cebola comum (*Allium cepa* L.), é uma espécie originária da Ásia, pertence à família Alliaceae e apresenta $2n = 2x = 16$ cromossomos. É uma hortaliça amplamente cultivada e consumida no mundo. Além de ser um excelente condimento, apresenta propriedades medicinais e, devido às propriedades antioxidantes e anticancerígenas, é considerado um alimento funcional (RODRIGUES et al., 2011). As plantas dessa espécie são consideradas bianuais, apresentam folhas cilíndricas e fistulosas, com 0,30 a 0,50 m de altura e coloração verde-escura.

A demanda por variedades específicas adaptadas às condições locais é de grande interesse em função de ser uma planta sensível ao fotoperíodo e só formar bulbos quando submetido a condições ambientais especiais, ou seja, baixas temperaturas e fotoperiodismo curtos (DONG et al., 2013).

No Brasil, há dois tipos de variedades produzidas, híbridos F1 e variedade de polinização aberta. A produção de híbridos F1 é considerada um dos principais objetivos dos programas de melhoramento de cebola. Porém, a principal restrição da produção de sementes de híbridos F1, refere-se ao tempo necessário para se produzir as linhagens endogâmicas por métodos convencionais (oito ciclos de autofecundação). Visto que a planta é alógama, os ciclos de autofecundação certamente levam à depressão por endogamia, pois as populações de cebola possuem alelos recessivos com efeitos deletérios (DHATT e THAKUR, 2014).

Em muitas outras espécies esse problema tem sido superado por produzir linhagens geneticamente homozigotas por meio da técnica haplo-diploidização, ou seja, produz as plantas haplóides e depois duplica-se o número de cromossomos usando agentes químicos como colchicina, orizalina ou trifluralina (BOHANEK, 2002).

As plantas haplóides podem ser produzidas com o uso de cultura de anteras, óvulos não-fertilizados, ovários ou cultura de botões florais. Dos diferentes métodos para produção de haplóides de cebola *in vitro*, a ginogênese foi a única relatada como sendo bem-sucedida (FAYOS, 2015). Geoffriau et al. (1997), relatou que a principal limitação da ginogênese em cebola é a baixa porcentagem de formação de embrião haplóide e a duplicação de cromossomos e sobrevivência de plantas da maioria dos materiais, no entanto, através de modificações nos protocolos de indução de haplóides, como utilização de diferentes meios de cultura, diferentes concentrações e tipos de reguladores de crescimento, e tamanho dos explantes, é possível reverter essa situação.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Induzir a formação de plantas haplóides *in vitro* de *Allium cepa* L. a partir de ovários não-fertilizados submetidos a diferentes combinações de reguladores de crescimento de plantas *in vitro*.

2.2 Específicos

Quantificar a porcentagem de explantes que formaram calos e embriões;

Identificar qual combinação de reguladores de crescimento proporcionou maior número de calos e embriões.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Classificação botânica

Allium cepa L., conhecida popularmente por cebola, é uma espécie que apresenta a seguinte classificação: Sub-divisão – Angiospermae; Classe – Monocotiledoneae; Sub-classe – Liliidae; Ordem – Liliales; Família – Alliaceae; Gênero – *Allium* e Espécie - *Allium cepa* L.

A cebola é descrita como uma planta monocotiledônea herbácea de ciclo vegetativo bienal, cuja parte comercial é um bulbo tunicado, que apresenta variação em formato, cor, pungência, tamanho e conservação pós-colheita (EMBRAPA, 2007).

De acordo com Rahn (1998), o caule forma bulbo e rizomas tuberosos envolvidos por bainha, com folhas basais que podem ser lineares, filiformes, lanceoladas ou ovaladas. Seu sistema reprodutivo é formado por um conjunto de flores, inflorescência, a qual desenvolve-se de forma esférica, em cimeira, as flores são hermafroditas e apresentam um odor peculiar característico da maioria dos representantes da família (WASUM et al., 2007).

3.2 Importância econômica

A cebola está entre as hortaliças de maior importância econômica no mundo, devido apresentarem uma variedade de usos, como na culinária e na medicina e indústria farmacêutica (ARSHAD et al., 2017). No Brasil, essa cultura é a terceira em importância econômica, ficando atrás apenas da batata e do tomate (HUNGER et al., 2013).

Em 2019 a safra brasileira de cebola foi de 1.556.885 toneladas produzidas em 48.146 hectares, com produtividade média de 32,34 t.ha⁻¹, distribuída nas Regiões Sul (43,91%), Sudeste (23,98%), Nordeste (20,24%), Centro-Oeste (11,82%) e Norte (0,05) (IBGE, 2019). Oscilações na produção entre anos ocorrem principalmente em função de variações nas condições climáticas e de estímulos de preços no ano anterior (EMBRAPA, 2014).

3.3 Indução de haplóides em cebola

Em cebola, cultivares híbridos são considerados superiores às variedades de polinização aberta, devido apresentarem maior uniformidade e heterose expressada (DHATT e THAKUR, 2014). No entanto, a produção de híbridos F1 apresenta desafios, como a demanda de tempo e trabalho intensivo pelo método convencional, o que requer autopolinização manual essencial para gerar linhas puras de genitores homozigotos. Desta forma, são necessários oito ou mais

ciclos de endogamia para estabelecer linhas regulares suficientes que possam ser aplicadas na produção de híbridos. Além disso, por ser uma planta de polinização cruzada a cebola sofre depressão endogâmica severa quando se auto-polinizada por várias gerações. Para superar esse problema, um método alternativo é a duplo-haploidização (BOHANEK, 2002). Essa técnica consiste de duas etapas, obtenção das plantas haplóides e depois a duplicação de seus cromossomos, tornando-a um duplo-haplóide (JAKSE e BOHANEK, 2003; CHEN et al., 2014).

O emprego da cultura de células, tecidos e órgãos para obtenção de plantas regeneradas *in vitro* é uma das principais técnicas da biotecnologia vegetal aplicada na propagação e no melhoramento genético de plantas (BORÉM e MIRANDA, 2013).

A produção de plantas haplóides pode ser obtida por meio de androgênese ou ginogênese. A androgênese é o processo de regeneração de plantas haplóides por meio de cultura de anteras ou cultura de micrósporos, enquanto a ginogênese se refere ao uso de gametófito feminino (óvulos, ovários) não-fertilizados para o desenvolvimento de plantas haplóides (KHAR, 2019). As espécies apresentam diferenças em sua capacidade de induzir haplóides via androgênese ou ginogênese, no entanto, a androgênese tem sido mais favorável (SEGUI-SIMARRO et al., 2011). Porém, foi observado que a cultura de anteras, apesar de ser o método mais bem-sucedido para o desenvolvimento de haplóides, não obteve sucesso na cultura da cebola, devido à recalcitrância, a presença de pólen ou anteras defeituosas, e a produção de albinos durante a cultura (GUREL et al., 2008).

Ao longo desses 20 anos de aplicação da ginogênese na indução *in vitro* de haplóides de cebola, já foram realizadas diversas melhorias na eficiência de sua produção, como o tipo de explante, o tamanho ideal do explante, e o emprego de diferentes tipos de reguladores de crescimento (auxina e citocinina) no meio de cultura, promovendo assim, melhores respostas ginogênicas.

A indução de haplóides pela via ginogênica pode ser alcançada através do cultivo *in vitro* de diferentes partes da flor não polinizada, como óvulos, placenta com óvulos anexados, ovários ou botões de flores inteiros (DHATT e THAKUR, 2014). Atualmente, o método mais eficiente para induzir plantas haplóides em cebola a partir do gametófito feminino é o cultivo de flores de cebola inteiras, sem subcultivo (BOHANEK et al, 2003). De acordo com Alan et al. (2004), o estágio ideal para cultivar as flores é entre 3 a 5 dias antes da antese, que corresponde ao botão da flor no tamanho de 3-5 mm de comprimento.

O meio de cultura é outro importante fator no desenvolvimento de linhagens duplo-haplóides a partir do cultivo *in vitro* de óvulos e ovários não-fertilizados, os principais meios já utilizados foram MS (Murashige e Skoog, 1962), meio B5 (Gamborg et al., 1968), BDS (Dustan e Short, 1977; Muren, 1989; Campion et al., 1992) e, depois o PGR (Michalik et al., 2000), o que tornou o protocolo em um único passo, simplificando a indução dos embriões haplóides. Foi relatado que o emprego dos reguladores de crescimento ácido-2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 6-benzilaminopurina (BAP) aumentam as respostas ginogênicas (BOHANEK E JAKSE, 1999). Michalik et al. (2000), trabalhando com diferentes combinações de 2,4-D e BAP em diferentes genótipos de cebola, relataram o maior rendimento de embriões ginogênicos nos meios B5 ou BDS suplementados com 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 2,0 mg.L⁻¹ de BAP.

Após a obtenção de plântulas haplóides, é necessário realizar a duplicação do seu material genético. A duplicação espontânea dos cromossomos foi descrita na ginogênese da cebola, no entanto, abaixo de 10% na maioria dos casos (JAKSE et al., 2010). A duplicação dos cromossomos pode ser induzida através da aplicação de agentes antimitóticos (colchicina, orizalina e trifluralina) no meio de cultura, regenerando plantas duplo-haplóides (DHs), materiais homozigotos, com a fertilidade restaurada que pode ser usada em diferentes estratégias de melhoramento porque todos os alelos das linhagens de DHs estão fixos e ajudam na eficiência da seleção de características quantitativas no melhoramento (BOHANEK, 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia e Melhoramento Vegetal, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (CCA-UFPB), localizado no município de Areia-PB, que está inserido na microrregião do Brejo Paraibano, caracterizada por sua elevada pluviosidade, em torno de 1500 mm anuais, com umidade relativa do ar da ordem de 85% e temperatura média anual de 22°C (ANTONINO et al., 2004).

4.2 Material vegetal

Bulbos da cultivar IPA-12 foram plantados em canteiros de tamanho 6 m x 1,2 m, o material foi cedido pelo Instituto de Pesquisa Agropecuária (IPA). Foi realizada adubação de fundação, com base na análise de solo e as recomendações para a cultura (EMBRAPA, 2007). O manejo da cultura foi realizado diariamente.

Com a formação e posterior desenvolvimento das inflorescências (Figura 1), as umbelas foram coletadas quando os botões florais medindo de 3 a 5 mm. Os botões florais foram removidos individualmente das umbelas com auxílio de pinças, em seguida, foram submetidos à desinfestação com álcool 70% por 3 minutos, e posteriormente, desinfestados com solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (NaClO) com três gotas de Tween 20, por 20 minutos e enxaguados quatro vezes com água destilada, deionizada e autoclavada.



Figura 1. A- Plantio de bulbos de cebola da cultivar IPA-12. B- Plantas de cebola cultivar IPA-12 em fase de florescimento.



Figura 2. A- Umbela no momento da colheita. B- Explantes (botões florais) utilizados no cultivo *in vitro*. (Barra: 1cm)

4.3 Cultivo *in vitro*

Para a indução de embriões ginogênicos foi utilizado o protocolo conforme descrito por Jakse e Bohanec (2003), botões florais inteiros após excisão da inflorescência, e desinfestação, foram inoculados em placa de Petri (90 mm x 15 mm) contendo meio BDS (Dunstan e Short, 1977) suplementado com 100 g.L⁻¹ de sacarose, 200 mg.L⁻¹ de prolina, 500 mg.L⁻¹ de mioinositol, 10 mg.L⁻¹ de sulfato de adenina e vitaminas B5, e diferentes combinações dos reguladores de crescimento 2,4-D (ácido-2,4-diclorofenoxiacético) e BAP (6-benzilaminopurina): T0 = 0 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 0 mg.L⁻¹ de BAP; T1 = 0 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg.L⁻¹ de BAP; T2 = 0 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 2,0 mg.L⁻¹ de BAP; T3 = 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 0 mg.L⁻¹ de BAP; T4 = 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg.L⁻¹ de BAP; T5 = 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 2,0 mg.L⁻¹ de BAP; T6 = 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 0 mg.L⁻¹ de BAP; T7 = 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg.L⁻¹ de BAP; T8 = 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 2,0 mg.L⁻¹ de BAP, o pH foi ajustado para 5,8 antes da adição de 6 g.L⁻¹ de ágar, em seguida, autoclavado por 15 minutos a 121°C.

Vinte botões florais foram inoculados em cada placa de Petri e, posteriormente, colocados em sala de crescimento com fotoperíodo de 16/8h a 25°C, e irradiância de 40 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, até a produção dos calos e/ou embriões.

Quando os botões florais inoculados mudaram da cor verde para o amarelo os embriões foram coletados e transferidos para meio MS (Murashige e Skoog, 1962) meia força, suplementados com 1,0 mg.L⁻¹ de AIB (ácido indolbutírico) + 1,0 mg.L⁻¹ de KIN (cinetina) para indução de raízes e desenvolvimento de embriões.

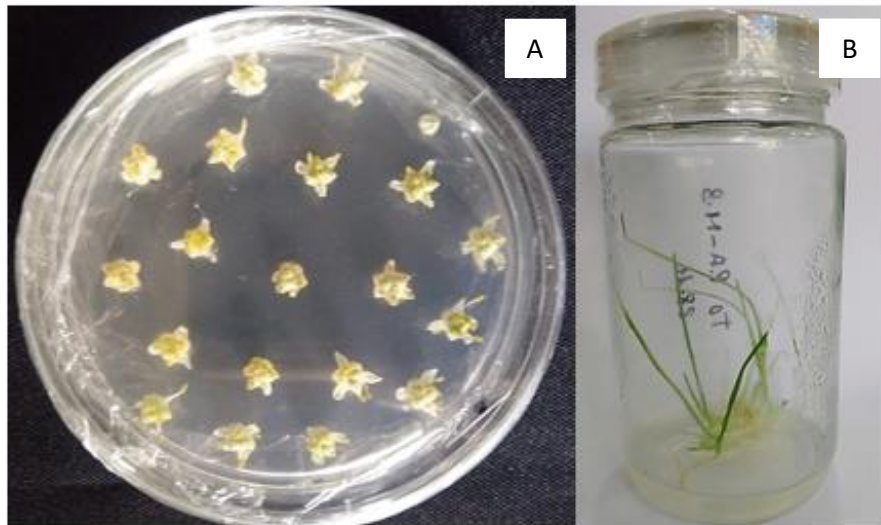


Figura 3. A- botões florais inoculados em meio de cultura para indução de haploides. B- Plântulas haplóides *in vitro* em meio de regeneração.

4.4 Aclimatização das plântulas

Após 3 a 4 semanas, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos de 7 cm³ contendo substrato PlantMax® e cobertos com sacos plásticos com pequeno orifício na parte superior para que ocorresse as trocas gasosas e impedisse a desidratação das plantas. As plantas foram mantidas por duas semanas, por duas semanas, diariamente foram feitos mais orifícios nos sacos plásticos, até que finalmente o saco foi retirado.

4.5 Avaliações

Foram contabilizados a porcentagem do número de explantes que formaram calos, a taxa de formação de calos (%), o número de explantes que formaram embriões e a taxa de formação de embriões (%).

As equações 1 e 2 foram utilizadas para calcular porcentagem de calos e embriões.

$$\text{Indução de calos} = (\text{Número de calos regenerados} / \text{Número de explantes inoculados}) * 100 \quad (1)$$

$$\text{Indução de embriões} = (\text{Número de embriões regenerados} / \text{Número de calos}) * 100 \quad (2)$$

4.6 Análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3^2 . Os tratamentos consistiram na combinação de doses de 2,4-D e BAP, totalizando assim 9 tratamentos, com 25 repetições cada.

Os dados foram submetidos a análise de variância e quando houve diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Todas as análises foram realizadas usando o software Genes (CRUZ, 2006).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao todo foram inoculados 4.500 botões florais, dos quais 2.100 foram descartados devido contaminação por fungos ou bactérias, totalizando 2.400 botões florais viáveis. O intumescimento dos ovários foi observado a partir de 6 a 8 dias da inoculação, e a produção de calos com 4 a 5 semanas de cultura (Figura 3).

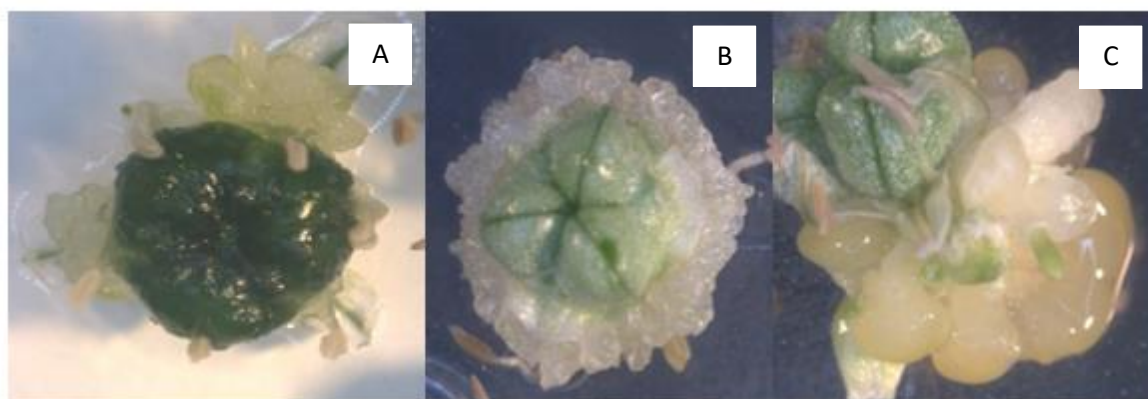


Figura 4. Diferentes estágios de desenvolvimento de calos e embriões em cultivar de cebola (IPA-12). A- Ovário intumescido. B- Indução de calos. C- Indução de embrião.

Dos 2.400 botões florais viáveis, 411 formaram calos e 98 formaram plântulas, onde a porcentagem obtida de calos foi de 22,83% e 5,44% de embriões (Tab. 1). Yarali e Yanmaz (2017), trabalhando com a cultivar de cebola Yakut, conseguiu obter uma taxa de formação de calo de 36,28%, a partir da cultura de botões florais.

Tabela 1. Total de formação de calos e embriões *in vitro* em cebola (*Allium cepa* L.).

TOTAL			
Nº de calos	Nº de embriões	% de calos	% de embriões
411	98	22,83	5,44

Houve interação significativa entre as doses de 2,4-D e de BAP no meio de indução apenas para a formação de calos (Tabela 2). Também foram significativas quando os fatores foram considerados isoladamente, ou seja, entre as doses de BAP para formação de calos e de plântulas, enquanto para 2,4-D, apenas formação de calos foi significativa.

Tabela 2. Análise de variância da influência de diferentes concentrações de BAP e 2,4-D sobre a regeneração *in vitro* de calos e plântulas de *Allium cepa* L. via ginogênese.

FV	GL	QM	
		Calos	Embriões
Doses de 2,4-D	2	93,41 ^{**}	7,54 ^{ns}
Doses de BAP	2	124,21 ^{**}	17,21 [*]
Doses de 2,4-D x Doses de BAP	4	67,2 ^{**}	2,54 ^{ns}
Resíduo	81		
Total	89		

ns, *, **: Não significativo e significativo a 5% e 1%, respectivamente, pelo teste F.

Não foi observado diferença no número de calos nos tratamentos com 0 mg.L⁻¹ de 2,4-D combinados às diferentes doses de BAP (0, 1 e 2 mg.L⁻¹). Já nos tratamentos com meio de cultura suplementado com a dose 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D combinado com diferentes concentrações de BAP (0, 1 e 2 mg.L⁻¹), o tratamento 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 2 mg.L⁻¹ de BAP apresentou o maior número de calos. Enquanto que, o tratamento com 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg.L⁻¹ de BAP apresentou o maior número de calos em relação a mesma dose de 2,4-D mas combinada com as demais concentrações de BAP (0 mg.L⁻¹ e 2 mg.L⁻¹) (Tabela 3).

O número de embriões nos tratamentos 0 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 0 mg.L⁻¹ de BAP e 0 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg.L⁻¹ de BAP foram semelhantes estatisticamente. Os tratamentos 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 0 mg.L⁻¹ de BAP e 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg.L⁻¹ de BAP, não diferiram entre si em relação ao número de embriões. Os tratamentos com meio de cultura suplementado com 2 mg.L⁻¹ de 2,4-D em combinação com diferentes doses de BAP (0, 1 e 2 mg.L⁻¹) resultou em número de embriões igual para todos os tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3. Comparações de médias da interação entre as diferentes doses de BAP e 2,4-D sobre a regeneração de calos e plântulas de cebola (*Allium cepa* L.) pelo teste de Tukey ao nível de a 5% de probabilidade.

Doses 2,4-D (mg.L ⁻¹)	Regeneração					
	Calos			Plântulas		
	Doses BAP (mg.L ⁻¹)					
	0	1	2	0	1	2
0	2,1 Aa	1,8 Ab	3,3 Ab	2,3 Aa	2,2 Aba	1,2 Ba
1	2,2 Ca	6,7 Ba	10,5 Aa	1,7 Aab	1,2 Aa	0 Bb
2	3,1 Ba	7,1 Aa	3,5 Bb	0,7 Ab	0 Ab	0,5 Aab

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si.

A maior taxa de formação de calo foi obtida do meio suplementado com 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 2 mg.L⁻¹ de BAP (52,5%), seguido pelo meio suplementado com 1,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg.L⁻¹ de BAP (37,5%), e 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg.L⁻¹ de BAP (35,5%). A taxa de

formação de embriões variou entre 0 e 11,5%. A maior taxa de formação de plântulas foi observada em meio de indução livre de auxina e citocinina (0 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 0 mg.L⁻¹ de BAP) (Tabela 4). Yarali e Yanmaz (2017), trabalhando com indução de haplóides em cebola via ginogênese, também observaram formação de brotos e raízes em meio livre de auxina e citocinina, 11,02% no genótipo “Bayram 1” e 37,23% no genótipo “Yakut”.

Tabela 4. Porcentagem de calos e embriões de *Allium cepa* L. induzidos *in vitro* a partir de diferentes concentrações de 2,4-D e BAP.

Tratamentos	% de calos	% de embriões
0 mg.L ⁻¹ de 2,4-D + 0 mg.L ⁻¹ de BAP	10,5	11,5
0 mg.L ⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg.L ⁻¹ de BAP	9	11
0 mg.L ⁻¹ de 2,4-D + 2,0 mg.L ⁻¹ de BAP	16,5	6
1,0 mg.L ⁻¹ de 2,4-D + 0 mg.L ⁻¹ de BAP	11	8,5
1,0 mg.L ⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg.L ⁻¹ de BAP	37,5	6
1,0 mg.L ⁻¹ de 2,4-D + 2,0 mg.L ⁻¹ de BAP	52,5	0
2,0 mg.L ⁻¹ de 2,4-D + 0 mg.L ⁻¹ de BAP	15,5	3,5
2,0 mg.L ⁻¹ de 2,4-D + 1,0 mg.L ⁻¹ de BAP	35,5	0
2,0 mg.L ⁻¹ de 2,4-D + 2,0 mg.L ⁻¹ de BAP	17,5	2,5

Os reguladores de crescimento de plantas adicionados ao meio de cultura têm efeito significativo sobre a ginogênese (MUKHAMBETZHANOV, 1997; BOHANEK, 2009; MUROVEC e BOHANEK, 2012). Estudos de indução de haplóides em cebola pela via da ginogênese relataram o uso de diferentes doses de 2,4-D como auxina e BAP como citocinina no meio de cultura (CAMPION et al., 1992; GEOFFRIAU et al., 1997; MARTINEZ et al., 1997; ALAN et al., 2003, 2004; BEKHEET, 2004; MUSIAL et al., 2005; REED, 2005; SULISTYANINGSIH et al., 2006; BOHANEK, 2009; FORODI et al., 2009; CHEN et al., 2011; YARALI E YANMAZ, 2013).

No entanto, diferentes fatores, como fatores genéticos, incluindo cultivar, genótipo da planta doadora e origem geográfica são considerados os mais importantes para o sucesso de indução de haplóides por via da ginogênese (CAMPION et al., 1992; BOHANEK e JAKSE, 1999; CHEN et al., 2011; ANANDHAN et al., 2014).

De um total de 19 plântulas que foram submetidas a aclimatização, apenas 04 sobreviveram. A aclimatização é uma fase crítica na cultura de tecidos vegetais. Nesta etapa, ocorre alteração do metabolismo heterotrófico para o autotrófico, e um grande número de espécies é sensível a essa modificação, levando as plantas à morte. Além dessa alteração, fatores

como genótipo, contaminação por patógenos, e estresse luminoso e hídrico também influenciam na sobrevivência das plantas durante a fase da aclimatização.

6 CONCLUSÃO

Maior número de plântulas foram obtidas em meio BDS livre de regulador de crescimento, enquanto a maior porcentagem de calos foi obtida quando o meio BDS foi suplementado com $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D + $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP.

O genótipo IPA-12 apresenta alta capacidade ginogênica, não sendo necessário o uso de reguladores de crescimento na indução de haplóides.

O nível de ploidia ainda não foi determinado, sendo necessário a continuação desse estudo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAN, A. R. et al. Production of gynogenic plants from hybrids of *Allium cepa* L. and *A. roylei* Stearn. **Plant Science**, v. 165, n. 6, p. 1201-1211, 2003.
- ALAN, A. R. et al. Fecund gynogenic lines from onion (*Allium cepa* L.) breeding materials. **Plant Science**, v. 167, n. 5, p. 1055-1066, 2004.
- ANANDHAN, Sivalingam et al. Variation in gynogenic potential for haploid induction in Indian shortday onions. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 74, n. 4, p. 526-528, 2014.
- ANTONINO, A. C. D. et al. Distribuição probabilística do fator de escala de dois solos do Estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 8, n. 2-3, p. 220-224, 2004.
- ARSHAD, Muhammad Sajid et al. Status and trends of nutraceuticals from onion and onion by-products: A critical review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 3, n. 1, p. 1280254, 2017.
- BEKHEET, S. A. Production of haploid plants of onion through *in vitro* gynogenesis. **Arab Univ. J. Agric. Sci., Ain Shams Univ**, v. 12, n. 2, p. 721-733, 2004.
- BOHANEK, B. Doubled-Haploid Onions. In: *Allium Crop Science: Recent Advances*, Rabinowitch, H. D. and L. Currah (Eds.). CAB International, Wallingford, U. K. ISBN: 9780851995106, pp: 145-157, 2002.
- BOHANEK, B. Doubled haploids via gynogenesis. *advances in haploid production in higher plants*. Ed.: Touraev vd. 2009.
- BOHANEK, B.; JAKŠE, M. Variations in gynogenic response among long-day onion (*Allium cepa* L.) accessions. **Plant Cell Reports**, v. 18, n. 9, p. 737-742, 1999.
- BOHANEK, B.; JAKSE, M.; HAVEY, M. J. Genetic analyses of gynogenetic haploid production in onion. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 128, n. 4, p. 571-574, 2003.
- BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. *Melhoramento de Plantas*. 6. ed. Viçosa: Editora UFV, 2013. 523p.
- CAMPION, Bruno et al. Advances in haploid plant induction in onion (*Allium cepa* L.) through *in vitro* gynogenesis. **Plant Science**, v. 86, n. 1, p. 97-104, 1992.
- CHEN, Jin-Feng et al. *In vitro* haploid and dihaploid production via unfertilized ovule culture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 104, n. 3, p. 311-319, 2011.
- COSTA, N. D.; DE RESENDE, G. M.. *Cultivo da cebola no Nordeste*. **Embrapa Semiárido-Sistema de Produção (INFOTECA-E)**, 2007.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, v. 2, 2006. 585p.
- DHATT, A. S.; THAKUR, Prerna. Production of doubled haploids in onion: A review. **Journal of Horticultural Sciences**, v. 9, n. 2, p. 107-112, 2014.
- DONG, Yinxin et al. The effect of cultivar, sowing date and transplant location in field on bolting of welsh onion (*Allium fistulosum* L.). **BMC plant biology**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2013.

DUNSTAN, D. I.; SHORT, K. C. Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa*. **Physiologia Plantarum**, v. 41, n. 1, p. 70-72, 1977.

FAYOS, Oreto et al. Doubled haploid production from Spanish onion (*Allium cepa* L.) germplasm: embryogenesis induction, plant regeneration and chromosome doubling. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 384, 2015.

FORODI, Bahram Rostam et al. Influence of spermidine on haploid plant production in Iranian onion (*Allium cepa* L.) populations through in vitro culture. **Horticulture Environment and Biotechnology**, v. 50, n. 5, p. 461-466, 2009.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental cell research**, v. 50, n. 1, p. 151-158, 1968.

GEOFFRIAUX, E.; KAHANE, R.; RANCILLAC, M. Variation of gynogenesis ability in onion (*Allium cepa* L.). **Euphytica**, v. 94, n. 1, p. 37-44, 1997.

GUREL, E.; GUREL, S.; LEMAUX, P. G. Biotechnology applications for sugar beet. **Critical reviews in plant sciences**, v. 27, n. 2, p. 108-140, 2008.

HUNGER, Helmut et al. Produtividade e análise econômica da cultura da cebola sob diferentes densidades de plantio e níveis de adubação. 2013.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2019. Link de acesso: <https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/1612#resultado>.

JAKSE, M.; BOHANEK, B. Haploid Induction in Onion via Gynogenesis. In: Doubled Haploid Production in Crop Plants, MALUSZYNSKI, M., KASHA, K. J., FOSTER, B. P. and SZAREJKO, I. (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, p. 281-285, 2003.

KHAR, A. N. I. L. et al. Present status of haploidy research in onion (*Allium cepa*)-a review. **Ind J Agric Sci**, v. 89, p. 396-405, 2019.

MARTINEZ, L. E.; AGÜERO, C. B.; GALMARINI, C. R. Obtention of haploid plants by ovaries and ovules culture in onion (*Allium cepa* L.). In: **I International Symposium on Edible Alliaceae 433**. 1994. p. 447-454.

MICHALIK, B.; ADAMUS, A.; NOWAK, E.. Gynogenesis in Polish onion cultivars. **Journal of plant physiology**, v. 156, n. 2, p. 211-216, 2000.

MUKHAMBETZHANOV, Serik K. Culture of nonfertilized female gametophytes *in vitro*. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 48, n. 2, p. 111-119, 1997.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiol. plant**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

MUREN, R. C. **Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion**. 1989.

MUROVEC, Jana; BOHANEK, Borut. Haploids and doubled haploids in plant breeding. **Plant Breeding, Dr. Ibrokhim Abdurakhmonov (Ed.)**.-2012.-P, p. 87-106, 2011.

MUSIAL, Krystyna et al. The development of onion (*Allium cepa* L.) embryo sacs in vitro and gynogenesis induction in relation to flower size. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 41, n. 4, p. 446-452, 2005.

OLIVEIRA, Valter Rodrigues; MAROUELLI, Waldir Aparecido; MADEIRA, Nuno Rodrigo. Influência de fatores climáticos na produção da cebola. **Embrapa Hortaliças- Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E)**, 2014.

RAHN, K. Alliaceae. In: KUBITZKI, K. (Ed.). The families and genera of vascular plants. Berlin: Springer- Verlag.. Vol. 3. p.70-78. 1998.

REED, S. M. Haploid cultures, Plant Development and Biotechnology. Ed. by Robert N. Trigiano and Dennis J. Gray. **Crc Press** 17:225-235, 2005.

RODRIGUES, S. R.; CALDAS, S. S.; FURLONG, E. B.; PRIMEL, E. G. Otimização e validação de método empregando QuEChERS modificado E LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotóxicos em cebola. Química Nova, São Paulo, v.34, n.5, p.780-786, 2011.

SULISTYANINGSIH, Endang; AOYAGI, Youhei; TASHIRO, Yosuke. Flower bud culture of shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum group) with cytogenetic analysis of resulting gynogenic plants and somaclones. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 86, n. 2, p. 249-255, 2006.

WASUM, R. A.; BORDIN, J.; SINIGAGLIA, C. Considerações taxônomicas. In. BARBIERI, R.L. (Ed.) Cebola: ciência, arte e história. 2ª ed. **Brasília-DF. Embrapa Informação tecnológica**, 2007.

YARALI, Faika; YANMAZ, Ruhsar. The effects of plant growth regulators on in vitro gynogenic embryo formation in onion (*Allium cepa* L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 40, p. 1977-1983, 2017.

YARALI, F.; YANMAZ, R. Utilization of haploidy techniques in breeding of *Allium* species. **Turk. J. Sci. Rev**, v. 6, n. 2, p. 44-50, 2013.