



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**CRISTINE AGRINE PEREIRA DOS SANTOS RODRIGUES**

**INDUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES GINOGENICOS DE CEBOLA (*Allium cepa* L.)**  
**A PARTIR DE OVÁRIOS NÃO FECUNDADOS**

**AREIA**  
**2024**

**CRISTINE AGRINE PEREIRA DOS SANTOS RODRIGUES**

**INDUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES GINOGÊNICOS DE CEBOLA (*Allium cepa* L.)  
A PARTIR DE OVÁRIOS NÃO FECUNDADOS**

Tese submetida como requisito para  
obtenção do grau de Doutor em Agronomia,  
no Programa de Pós-graduação em  
Agronomia.

*Sob a Orientação do Professor*

**Mailson Monteiro do Rêgo**

*e Coorientação*

**Júlio Carlos Polimeni de Mesquita**

**AREIA  
2024**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

R696i Rodrigues, Cristine Agrine Pereira dos Santos.

Indução in vitro de embriões ginogênicos de cebola  
(Allium cepa L.) a partir de ovários não fecundados /  
Cristine Agrine Pereira Dos Santos Rodrigues. -  
Areia:UFPB/CCA, 2024.

88 f. : il.

Orientação: Mailson Monteiro do Rêgo.

Coorientação: Júlio Carlos Polimeni de Mesquita.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCA.

1. Agronomia. 2. Ginogênese. 3. Haploide. 4. Allium  
cepa. I. Rêgo, Mailson Monteiro do. II. Mesquita, Júlio  
Carlos Polimeni de. III. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 631/635(043.2)

CRISTINE AGRINE PEREIRA DOS SANTOS RODRIGUES

**INDUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES GINOGÊNICOS DE CEBOLA (*Allium cepa* L.) A PARTIR DE OVÁRIOS NÃO FECUNDADOS**

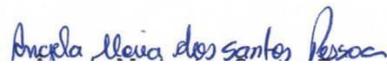
Aprovada como parte das exigências para obtenção do título de DOUTORA em AGRONOMIA (Agricultura Tropical) pela comissão examinadora:



---

Prof. Dr. Mailson Monteiro do Rêgo -CCA/UFPB

Orientador



---

Profa. Dra. Ângela Maria dos Santos Pessoa- UFERSA

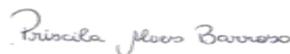
Examinador



---

Profa. Dra. Riselane de Lucena Alcântara Bruno – CCA/UFPB

Examinador



---

Profa. Dra. Priscila Alves Barroso – UFPI

Examinador

Aprovado em: 04/07/2022



Presidente da comissão examinadora

Prof. Dr. Mailson Monteiro do Rêgo

Orientador

## AGRADECIMENTOS

A Deus, razão da minha vida, quem me dá força para lutar e superar obstáculos, não me deixando desistir;

À Universidade Federal da Paraíba, ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, a qual foi minha casa durante todo esse tempo;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos desde minha graduação;

Ao meu Orientador, Professor Mailson, pelas orientações, ensinamentos e pelas oportunidades.

À Professora Elizanilda pelos ensinamentos, oportunidades;

Aos professores do PPGA, pelos ensinamentos;

À banca examinadora por toda ajuda em melhorar essa pesquisa, nas pessoas dos professores Priscila Barroso, Riselane Bruno e Ângela Maria;

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco na pessoa de meu coorientador Júlio Mesquita por sempre abrir as portas do Instituto para nos receber e fornecer o material vegetal da pesquisa;

Ao meu esposo, amigo e companheiro João Batista Belarmino, gratidão imensa pelo apoio, pelo carinho e por sempre acreditar em minha capacidade de ir além. Por entender minhas horas de angústias por tantos momentos desta trajetória;

À minha família, Cícera Pereira de França, Ademar Gabriel dos Santos, Adelson, Adjailson e Adenilson; a Cecília que mesmo cansada de uma semana de trabalho não hesitava em me ajudar, sendo minha melhor amiga em momentos difíceis;

À Elisandra, aluna de iniciação científica, por todo ensinamento e dedicação a esta pesquisa;

À Michelle, pela ajuda, dedicação e amizade de longas data;

À Kaline, por sempre ter paciência e saber escutar, ensinar e pronta para ajudar;

A Witalo por toda ajuda e paciência;

À Angeline, por toda ajuda nessa pesquisa, por sua doação;

À Katiane, Jéssica Nobre, Geovana, Lindamara, Kadson, Laís, Glaucia, Jacy e Ayrton pela amizade e carinho a todos do Laboratório de Biotecnologia Vegetal;

A Bruno pelas conversas e pelas muitas viagens de idas e vindas da UFPB, e que nunca me disse não;

A todos os amigos e familiares, por me incentivarem a continuar e enviarem boas vibrações e orações me dando forças para a caminhada

## RESUMO GERAL

Atualmente a obtenção de plantas haploides e duplo haploide em *Allium cepa* L, tem sido o objetivo das empresas agrícolas e também para programas de melhoramento genético. A utilização da técnica de indução via cultivo *in vitro* em programas de melhoramento não é uma prática rotineira porque não existem métodos eficientes para regenerar haploides. Para realização da técnica há necessidade de haver protocolos de obtenção de haploides. Portanto o objetivo geral deste trabalho foi otimizar um protocolo através da cultura *in vitro* de botões florais de *Allium cepa* L. A fim de induzir embriões ginogênicos. Os experimentos foram desenvolvidos na UFPB/CCA no laboratório de biotecnologia vegetal. Utilizou-se botões não fertilizados da variedade IPA-11 e BRS Alfa São Francisco que foram inoculados em meio de cultura BDS, MS e B5, sendo inoculados 20 botões florais não fertilizados em placa de Petri por 120 dias. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $3^2$ , os tratamentos consistiram na combinação de doses 0, 1.0 e 2.0  $\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4-D e 0, 1.0 e 2.0  $\text{mg.L}^{-1}$  de BAP, com 7 repetições cada. As variáveis analisadas foram : Indução de bulbo formados, número de embriões formados , número de calos formados, diâmetro do calo, número de folhas, comprimento da folha principal, comprimento da raiz principal, número de calo formado por variedade, número de embriões formados por variedade, número de plântulas albinas formadas por variedade, porcentagem de calo por variedade, porcentagem de embriões por variedade, porcentagem de plantas albinas por variedade, porcentagem de calo formado por tratamento e porcentagem de embriões formados por tratamento. O segundo experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial  $2^2$ , o fatorial correspondeu a dois meios Michalik e Adhiyamaan e duas variedades de cebola IPA 11 e BRS Alfa São Francisco. As variáveis analisadas por tratamentos para cada variedade foram: número de calo, número de embrião formado, botões vitrificados, botões viáveis, placas contaminadas, porcentagem de calo formado, número de plântulas. O terceiro experimento foi composto por três meios de cultivo diferentes B5, BDS e MS, suplementados com 2,0  $\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4 D e 2,0  $\text{mg.L}^{-1}$  de BAP, seguindo os mesmos protocolos dos demais experimentos anteriores. Nesse experimento avaliou-se: formação de brotos, número de embriões, número de calos, calos friáveis, calos oxidados, botões viáveis e botões vitrificados. Os dados foram submetidos a análise de variância e quando houve diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Observou-se que os tratamentos mais responsivos tinham em sua composição 2,0  $\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4-D + 2,0  $\text{mg.L}^{-1}$  de BAP. O meio de cultura BDS quando suplementado com poliaminas promoveu maior eficiência na indução de embriões ginogênicos para a variedade IPA 11, assim como também evidenciou maior número de calos, menor oxidação dos explantes. Quanto aos meios testados para a indução o BDS proporcionou um maior percentual de embriões e menor formação de calos e menor oxidação dos calos enquanto os meios MS e B5 apresentaram maior taxa de calos oxidados e menor número de embriões. Portanto, pode-se concluir que o meio BDS suplementado com doses de 2  $\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4 D e 2,0  $\text{mg.L}^{-1}$  de BAP induzem de forma satisfatória a formação de embriões para as duas variedades, e ao utilizar putrescina e spermidina essas frequências aumentam para a variedade BRS Alfa São Francisco. Já o BDS desempenha melhor desenvolvimento na indução. Ambos os experimentos desempenham melhoria na indução de haploide de cebola.

**Palavras-chave:** ginogênese; haploide; *Allium cepa*.

## ABSTRACT GENERAL

Currently, obtaining haploid and double haploid plants in *Allium cepa* L has been the objective of agricultural companies and also for genetic improvement programs. The use of the induction technique via in vitro cultivation in breeding programs is not a routine practice because there are no efficient methods to regenerate haploids. To carry out the technique, there is a need for protocols for obtaining haploids. Therefore, the general objective of this work was to optimize a protocol through the in vitro culture of flower buds of *Allium cepa* L. In order to induce gynogenic embryos. The experiments were developed at the UFPB/CCA in the plant biotechnology laboratory. Non-fertilized buds of the variety IPA-11 and BRS Alfa São Francisco were inoculated in BDS, MS and B5 culture medium, with 20 non-fertilized flower buds inoculated in a Petri dish for 120 days. The experiment was conducted in a completely randomized design, in a 32 factorial scheme, the treatments consisted of a combination of doses of 0, 1.0 and 2.0 mg. L<sup>-1</sup> of 2,4-D and 0, 1.0 and 2.0 mg. L<sup>-1</sup> of BAP, with 7 repetitions each. The variables analyzed were: Induction of bulb formed, number of embryos formed, number of calluses formed, callus diameter, number of leaves, length of main leaf, length of main root, number of callus formed per variety, number of embryos formed per variety, number of albino seedlings formed per variety, percentage of callus per variety, percentage of embryos per variety, percentage of albino plants per variety, percentage of callus formed per treatment and percentage of embryos formed per treatment. Completely randomized, in a factorial 22 scheme, the factorial corresponded to two means Michalik and Adhiyamaan and two varieties of onion IPA 11 and BRS Alfa São Francisco. The variables analyzed by treatments for each variety were: number of callus, number of formed embryos, vitrified buds, viable buds, contaminated plates, percentage of formed callus, number of seedlings. The third experiment consisted of three different culture media B5, BDS and MS, supplemented with 2.0 mg. L<sup>-1</sup> of 2.4 D and 2.0 mg. L<sup>-1</sup> of BAP, following the same protocols as the others. Previous experiments. In this experiment, the following were evaluated: shoot formation, number of embryos, number of calluses, friable calluses, oxidized calluses, viable buds and vitrified buds. Data were submitted to analysis of variance and when there were significant differences, means were compared using the Scott-Knott test at a 5% probability level. It was observed that the most responsive treatments had 2.0 mg. L<sup>-1</sup> of 2,4-D + 2.0 mg. L<sup>-1</sup> of BAP in their composition. The BDS culture medium, when supplemented with polyamines, promoted greater efficiency in the induction of gynogenic embryos for the IPA 11 variety, as well as showing a greater number of calluses and less oxidation of the explants. As for the media tested for induction, BDS provided a higher percentage of embryos and less callus formation and less callus oxidation, while MS and B5 medium showed a higher rate of oxidized calluses and a smaller number of embryos. Therefore, it can be concluded that the BDS medium supplemented with doses of 2 mg.L<sup>-1</sup> of 2.4D and 2.0 mg.L<sup>-1</sup> and BAP satisfactorily induce the induction of embryos for both varieties, and when using putrescine and spermidine these frequencies increase for the BRS alto franciscana variety. BDS performs better development in induction. Both experiments perform improvement in onion haploid induction.

**Keywords:** gynogenesis; haploid; *Allium cepa*.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>8</b>
<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>10</b>
Aspectos botânicos e morfológicos da espécie.....	10
Importância econômica.....	12
Melhoramento genético da cebola e o cultivo de haplóides.....	13
Uso dos reguladores de crescimento na indução de haploides.....	16
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>19</b>
<b>CAPÍTULO I: Indução de embriões ginogênicos em cebola a partir de botões florais não fertilizados.....</b>	<b>25</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>25</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
2.1 Local do experimento.....	28
2.2 Material vegetal.....	28
2.3 Desinfestação dos botões florais.....	28
2.4 Meio de Regeneração.....	29
2.5 Aclimatização das plântulas regeneradas.....	30
2.6 Níveis de ploidia.....	30
2.7 Caracterização.....	30
2.8 Análise estatística.....	31
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>
<b>CAPÍTULO II: Efeito de meios suplementados com poliaminas na indução de embriões ginogênicos em cebola.....</b>	<b>54</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>54</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>57</b>
2.1 Local do experimento.....	57
2.2 Material vegetal.....	57
2.3 Meio de indução.....	58
2.4 Obtenção de embriões.....	58

<b>2.5 Regeneração e Aclimação.....</b>	<b>58</b>
<b>2.6 Análise estatística.....</b>	<b>59</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>
<b>8 CAPÍTULO III: Uso de diferentes meios de cultura na indução in vitro de cebola.....</b>	<b>75</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>75</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>77</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>78</b>
<b>2.1 Local do experimento.....</b>	<b>78</b>
<b>2.2 Material vegetal.....</b>	<b>78</b>
<b>2.3 Desinfestação do material vegetal.....</b>	<b>78</b>
<b>2.4 Inoculação e caracterização.....</b>	<b>78</b>
<b>2.5 Análise estatística.....</b>	<b>82</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>82</b>
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>86</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>87</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

A cebola (*Allium cepa* L.) é uma planta herbácea monocotiledônea pertencente à família Alliaceae, com registros de mais de 5.000 anos A.C, encontrados no antigo Egito, é considerada como uma das mais antigas plantas cultivadas (MELO, 2007). A preocupação com a baixa produtividade da cebola tem sido observada em muitos países tropicais devido ao cultivo por ser uma cultura de ciclo curto (90-130 dias), tendo uso predominante de sementes oriundas de variedades de polinização aberta, sensíveis a patógenos e estresses abióticos a exemplo da seca, salinidade, alta temperatura e deficiência nutricional esta preferência por cultivares variedades de polinização aberta (VPa) se deve em parte pela não existência de híbridos adaptados às condições locais, já que são desenvolvidos em outras regiões e países. Já as variedades de VPa em uso, foram desenvolvidos na região de cultivo e têm uma base genética mais ampla, se comparado com híbridos (LEE et al., 2018).

No Brasil, a oferta de cebola é bem distribuída ao longo do ano devido à exigência de cultivares adaptadas as diversas regiões produtoras do país (SANTOS et al., 2013). Porém, durante os meses de março a junho, o mercado nacional sofre escassez de cebola, em que ocorrem oscilações de produção e de oferta (TEIXERA, 2015). Sabe-se que para expressar o potencial produtivo, a planta de cebola necessita de temperaturas amenas (9 a 13 °C) no início do desenvolvimento e temperaturas mais elevadas durante a maturação (SANTOS et al., 2012). Relacionar as condições climáticas do local de cultivo às repostas fisiológicas das espécies é de fundamental importância no melhoramento genético, principalmente, quando se deseja desenvolver híbridos mais adaptados, produtivos e de maior durabilidade pós-colheita (FORTEA, 2017; AMALFITANO et al., 2019).

A obtenção de plantas haploides e duplo haploide é um dos principais objetivos de muitas empresas agrícolas e programas de melhoramento genético. O cruzamento entre duas linhagens puras permite obter híbridos homocigotos para todos os seus caracteres. Este tipo de organismo apresenta algumas características agrônômicas de grande valor, como por exemplo vigor híbrido, maior resistência a diferentes estresses bióticos e abióticos e homogeneidade nas culturas assim como a escolha de genótipo e a região a ser plantada também deve ser levada em consideração pelos melhoristas durante a seleção para indução de plantas haploides uma devido o processo de estabilidade e adaptabilidade aos locais cultivo que elas passam (IKEDA et al., 2019; TANAKA et al., 2020).

No melhoramento convencional de plantas alógamas, o processo usado para fixação de

genes é demorado e trabalhoso, devido a necessidade de sucessivos cruzamentos objetivando obter linhagens totalmente puras (homozigotas), fundamentais para garantia da manutenção do perfil genético da cultura (CANÇADO, 2002; BOREM et al., 2021).

A técnica de haploidização pode acelerar este processo, permitindo a obtenção de linhagens completamente homozigotas em uma única geração, diminuindo o tempo necessário na obtenção de linhagens de interesse, os custos de mão de obra e de produção (KHAN et al., 2020). Sendo homozigotas, as plantas geradas ficarão livres de problemas como dominância e recessividade, eliminando o efeito da heterozigose (SEGUI SAMARRO 2010a).

Dificuldades essas que afetam o desenvolvimento de linhagens homozigotas em cebola usando abordagens convencionais, incluindo depressão endogamia grave que é a de mais difícil além da espécie ser bianual, a necessidade de seleção de gerações a longo prazo e heterozigosidade comparativamente alta (HAVEY, 1993; BOHANEC, 2002; ALAN et al., 2004; HYDE et al., 2012).

As plantas haplóides que são obtidas por cultivo *in vitro* possuirão apenas a metade do número cromossômico da espécie, sendo portanto estéres, sendo assim é necessário restaurar a sua fertilidade por meio da duplicação cromossômica, que pode ser espontânea ou induzida, obtida com a utilização de antimetabólitos a exemplo da colchicina (DUNWELL, 2010; FORTEA, 2017). As plantas resultantes da duplicação cromossômica são chamadas de duplo-haplóides e possuem seu conteúdo genético duplicado e restabelecido para o normal.

Os métodos mais utilizados na produção de plantas haploides e duplo-haplóides em hortaliças são a androgênese e a ginogênese (GERMANÀ, 2011). A androgênese é o estágio pelo qual ocorre o desenvolvimento de uma nova planta, através do cultura *in vitro* de anteras ou micrósporos (célula gamética masculina jovem), sem que haja a fertilização (AHMADI, 2020). A ginogênese é o processo de indução de embriões haploides através do desenvolvimento de óvulos/ovários sem a participação efetiva do grão de pólen (WEDZONY et al., 2009; SEGUÍ SIMARRO, 2010b). Portanto o objetivo geral deste trabalho foi otimizar protocolos através da cultura *in vitro* de botões florais de cebola a fim de induzir embriões ginogênicos.

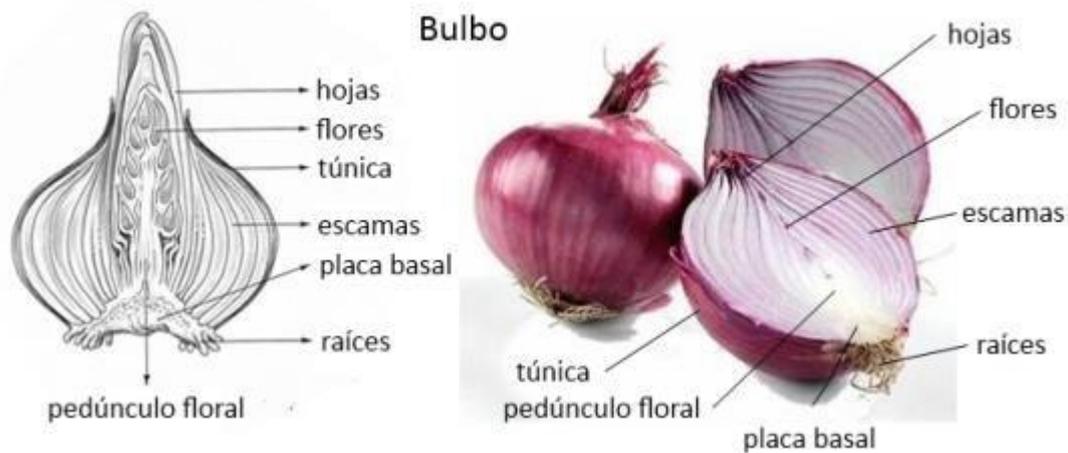
## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### Aspectos botânico e morfológico da espécie

A cebola faz parte da família Liliaceae e pertence ao gênero *Allium*, e da espécie *Allium cepa* L. (MANFRON et al., 1992). A cebola (*Allium cepa* L.) é uma espécie diploide ( $2n=16$ ), herbácea, cuja parte comestível é o bulbo tunicado, que apresenta variações em formato, cor, pungência, tamanho e conservação pós-colheita (CASTELLANE et al., 1990). Originária de regiões de clima temperado, sendo a Ásia seu centro de origem primário incluindo o Paquistão, Afeganistão, Irã e partes do Sul da antiga União Soviética e como centro de origem secundário, o Oriente Médio e a região do Mediterrâneo (VAVILOV, 1963; WENDELBO, 1971).

As espécies mais próximas são *A. galanthum*, *A. oschaninii* e *A. vavilovii*, as quais ainda são espécies silvestres encontradas em áreas da antiga União Soviética e no Afeganistão (HANELT, 1990; GOLDMAN et al., 2001). O processo reprodutivo completo da cebola (semente a semente) é demorado, levando cerca de dois anos e meio. Trata-se de uma espécie de dias longos com relação à formação dos bulbos, ou seja, bulbifica somente com um fotoperíodo acima de um determinado valor crítico, que depende da cultivar (JONES & MANN, 1963; BREWSTER, 1977).

Suas folhas são divididas em bainha, parte basal e o limbo, que é a parte superior. As bainhas das folhas mais velhas, da parte exterior, costumam ser mais brilhantes e chamativas, e são elas que formam as escamas da cebola (Figura 1). Mais do que isso, protegem todas as bainhas internas (VALENCIO, 2004). O bulbo é a parte que comemos, que pode ter um sabor variante entre doce, picante e meio azedo, o caule tem um formato de disco, e fica na base do bulbo essa parte toda da cebola fica abaixo do solo, cerca de 40 centímetros abaixo do solo as raízes ficam ao redor do caule no ciclo vegetativo, mas quando outras raízes começam a ser produzidas, as antigas mais próximas do centro do caule vão morrendo. As folhas são cobertas de uma camada cerosa, que impede doenças além de se proteger contra a desidratação (MARCUIZZO et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2004).



**Figura 1:** Morfologia do bulbo tunicado de *Allium cepa* L., mostrando a região do prato na porção inferior e as gemas na porção central do bulbo. FONTE: (PASTRO, 2015).

As cebolas podem ser redondas ou achatadas, e podem ser encontradas nas cores roxa, branca, amarela e vermelha (IPGRI 2001). As cultivares de cebola são classificadas em quatro grupos em função do número de horas luz diária requerido para iniciar o processo de bulbificação sendo as seguintes classificações, de dias curtos (DC – a bulbificação é iniciada em dias com 11-12 horas de luz), os bulbos de dias intermediários (DI – exigem 13 ou mais horas de luz), de dias longos (DL – requerem acima de 14 horas de luz diária), de dias muito longos (DML – exigem fotoperíodo superior a 15 horas de luz) (SILVA e VIZZOTTO, 1990; COSTA, 2014).

Após a formação do bulbo, a planta toda entra em dormência, as lâminas foliares próximas ao centro do bulbo abortam e as bainhas destas sofrem um processo de engrossamento, convertendo-se em órgãos de reserva na passagem da fase vegetativa para a reprodutiva em *Allium cepa*, a temperatura é o fator de maior importância (OLIVEIRA et al., 2004).

Quando inicia-se a fase do florescimento, observa-se a emissão do escapo floral no centro da planta de onde se insere o pseudocaule e, durante esse processo, verifica-se uma acentuada produção de substâncias giberelinas antes da formação da inflorescência, sugerindo uma associação com o frio (vernalização) (JONES & MANN, 1963).

Na extremidade de cada escapo floral se forma uma inflorescência esférica simples tipo umbela, envolta por uma película que se rompe antes da abertura das flores. A flor é hermafrodita e compreende três carpelos fundidos em seu pistilo, seis estames (três internos e três externos), um estilete, três segmentos de periantos interiores e três exteriores o ovário é

súpero e contém três lóculos, com dois rudimentos seminiais em cada um, os nectários se localizam na base dos estames e o néctar é acumulado entre os estames internos e externos (JONES & MANN, 1963).

As anteras emitem quase todo o pólen durante um período de 9 a 17 horas, 26 a 36 horas antes que o estigma esteja receptivo essa diferença entre a liberação do pólen maduro e a não receptividade do estigma explica por que a cebola é uma planta de polinização tipicamente cruzada (alógama), essa assincronia entre a maturidade dos órgãos sexuais favorece a polinização cruzada, que ocorre com, aproximadamente, 93% esse fenômeno recebe o nome de protandria ou dicogamia protândrica (MELO, 2007). A polinização é realizada principalmente por abelhas, ainda que seja frequente também a intervenção de moscas e vespas (MALUF, 1999).

A baixa taxa de autofecundação existente dá-se por meio da transferência de pólen entre flores de uma mesma umbela ou entre flores de umbelas diferentes de uma mesma planta, mas é impossível a sua ocorrência dentro de uma flor, individualmente, os efeitos da depressão por autofecundações sucessivas na cebola são bem acentuados, sendo mais pronunciados na segunda geração (S2) (RESENDE et al., 2007).

### **Importância econômica**

A cebola está entre as primeiras plantas cultivadas trazidas da Europa para as Américas, começando com Colombo no Caribe, mais tarde a espécie foi introduzida várias vezes e estabelecida no início do século XVII no norte dos EUA, os europeus também levaram a cebola para o leste da Ásia durante o século XIX (FRISTSCH & FRIESEN, 2002). No Brasil o cultivo ocorreu com a chegada de imigrantes açorianos que colonizaram a região de Rio Grande do Sul, durante o século XVIII e início do século XIX (FRANÇA & CANDEIA, 1997; MELO et al., 1998).

No Brasil, a cebola (*Allium cepa* L.) é a terceira hortaliça em importância mundial e a principal hortaliça bulbo cultivada comercialmente em todo o mundo, no qual o Brasil ocupa a nona colocação como maior produtor, ficando atrás da China, Índia, Paquistão, Bangladesh, Indonésia, Vietnã, Rússia e Mianmar, respectivamente (KISHOR et al., 2017; KUMAR et al., 2017; IBGE, 2021). O nordeste responde por (24%) da produção de cebola no Brasil, as regiões que apresenta a maior produção é da região Sul que responde por (50%) da produção nacional (SANTOS et al., 2019). Os maiores países produtores de cebola utilizam híbridos F1 na quase totalidade de suas áreas de cultivo, no Brasil, mais de 70% das áreas ainda utilizam cultivares de polinização aberta (IBGE, 2021). Os poucos híbridos plantados

no Brasil são importados e se adaptam a uma área muito restrita do território. As cultivares importadas caracterizam-se pelos bulbos globulares achatados, película amarela clara e fina, escamas espessas, conteúdo baixo de matéria seca, sabor, odor e pungência mais suaves e pouca serosidade na folha. Possuem adaptação ampla quanto ao comprimento de dia, são bastante produtivas e resistentes ao florescimento, mas muito suscetíveis a doenças foliares (MALUF, 1999; LONGO, 2013). No nordeste brasileiro, a cebola foi introduzida no final da década de 40, produzida predominantemente no Vale do São Francisco, onde é cultivada durante o ano todo, com concentração de plantio nos meses de janeiro a março (RESENDE & COSTA, 2007). Estima-se que cerca de 70% da cebolicultura no Brasil e a produção está concentrada principalmente em áreas de agricultura familiar, além de uma importância na economia nacional que essa atividade proporciona, e também sua importância social devido à fixação de pequenos produtores na zona rural, reduzindo a migração para as grandes cidades (AGUIAR et al., 2017).

Cerca de 60.000 famílias de agricultores que têm a cebolicultura como atividade principal (EPAGRI, 2017). Anualmente 170.000 postos de trabalho são gerados pela cebolicultura somente na fase de produção (BOEING, 2018). Com tudo a produção brasileira atende apenas ao mercado interno, destinando o produto basicamente para consumo *in natura*, mas a utilização de bulbos de cebola como matéria prima para o processamento ainda é incipiente.

### **Melhoramento genético da cebola e o cultivo de haplóides**

Com o aparecimento de tecnologias de engenharia genética novas ferramentas foram acrescentadas aos programas de melhoramento clássico, contribuindo assim, para um crescente aumento da produção e produtividade, redução da utilização de agroquímicos e conservação da biodiversidade (FEHER, 2015). O uso da cultura de tecidos de plantas foi proposto no século XIX, com as teorias de totipotência de células vegetais (ALMEIDA et al., 2009). Mas só no início do século XX, em 1902, é que realmente apareceram os primeiros trabalhos de Haberlandt, com o cultivo de tecidos somáticos de várias espécies de plantas (KERBAUY, 1997). O cultivo de embriões imaturos *in vitro* teve como pioneiro Hanning, seguido por Knudson (1922) o qual obteve sucesso com embriões de orquídeas e, em 1925 Laibach conseguiu recuperar embriões de híbridos incompatíveis de plantas do gênero *Linum*, dando os primeiros passos para a utilização da técnica no melhoramento genético de plantas e, desde então, inúmeras outras conquistas foram alcançadas (ALMEIDA et al., 2009; SALGADO et al., 2017).

Das estratégias biotecnológicas já utilizadas, a cultura de tecidos e a biologia molecular são as que mais têm trazido resultados práticos para a agricultura. Utilizando-se da cultura de tecidos, através da totipotência celular é possível abreviar significativamente as etapas de obtenção de novas cultivares, impactando não apenas no tempo, mas também nos recursos investidos de maneira mais limpa e com menor impacto ambiental (FERREIRA; CALDAS; PEREIRA, 1998).

O Brasil é carente em programas de melhoramento de cebola, são poucos os programas de melhoramento os programas públicos que podem ser encontrados na Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e Instituto de Pesquisas Agronômicas (IPA).

A obtenção de híbridos de cebola demora de 15 a 20 anos, uma vez que um ciclo semente e-semente da cultura leva aproximadamente dois anos. A cebola é tem uma taxa de 93% de fecundação cruzada, sendo portanto uma planta alógama, vários são os métodos de melhoramento aplicáveis a cultura (LONGO, 2013).

O melhoramento de plantas alógamas é realizado pelo aumento da frequência de genes favoráveis ou pela exploração do vigor híbrido ou heterose (BRUCKNER, 1997). O aumento na frequência de genes favoráveis pode ser conseguida por meio da seleção em massa ou pela seleção com teste de progênies enquanto o vigor híbrido é explorado por meio de híbridos ou variedades sintéticas (REGO, 2010).

Os grandes desafios enfrentado por melhoristas de cebola é o longo ciclo da espécie e a baixa variabilidade genética das linhas A (macho-estéril-MS) e B (linha mantenedora) tendo limitado a obtenção de híbridos no Brasil, a utilização da técnica da cultura de tecidos vegetais, especialmente a cultura *in vitro* de óvulos, ovários ou botões florais de cebola, é possível reduzir o tempo de obtenção de linhas “C” (polinizadoras) homozigotas, criar variabilidade e desenvolver novas variedades (LOPES & SOUSA, 2019).

No entanto a indução de plantas haploides ou duplo-haploides a partir da cultura de óvulos (ginogênese) oferece ao melhoramento convencional a possibilidade de obter linhas puras, derivadas de óvulos oriundos de plantas das gerações F1 ou F2 (CAMPION et al., 1995). Duplo haploides (DHs) são indivíduos totalmente homozigotos para todos os seus loci obtidos por duplicação cromossômica espontânea ou artificial de um genoma haploide. Haploides são indivíduos com número de cromossomos que é metade do número básico da espécie, ou seja, com o mesmo número de cromossomos de um gametada espécie (FORTEA et al., 2017). Sua

incapacidade de realizar a meiose correta (os cromossomos não têm suas contrapartes e não há pareamento absoluto) os torna indivíduos estéreis que impedem a propagação da planta. Por isso é necessário conseguir a duplicação cromossômica e obter indivíduos DHs (CUBERO, 2003).

Em muitas das espécies em que esta técnica tem sido utilizada, a duplicação cromossômica ocorre de forma espontânea, mas sempre há alguns indivíduos em que a duplicação do material genético não ocorre e formam-se plantas haploides estéreis (SEGÚ-SIMARRO & WALNUT, 2008).

Mundialmente, tornou-se rotina o emprego da técnica de haploide e de duplo- haploide por empresas e laboratórios envolvidos no melhoramento a técnica de cultura de tecidos a fim de se obter plantas haploide e duplo haploides tornou-se rotina por empresas e laboratórios envolvidos no melhoramento de ampla gama de espécies, visando acelerar o melhoramento genético (GERMANÀ, 2011 ).

É visando ampliar o desenvolvimento da cultura da cebola, que os programas de melhoramento genético de plantas, vêm buscando selecionar genótipos de cebola mais adaptados a condições edafoclimáticas estressantes e com resistências a doenças, sabendo que a adaptação de cultivares de cebola é condicionada por fatores ambientais, notadamente fotoperíodo e temperatura, o que limita a recomendação de uma mesma cultivar para uma faixa ampla de latitudes, se as condições climáticas não satisfizerem as exigências da cultura, pode haver perda na produtividade (FILGUEIRA, 2008).

Durantes alguns anos tem-se realizado diversos ensaios *in vitro* com plantas do gênero *Allium* focando em vários objetivos, tais como: conservação de germoplasma (ELLIS et al., 2005; VIEIRA et al., 2014), estudos sobre embriogênese somática (FEREOL et al., 2002) e transformação genética (KENEL et al., 2010). Entretanto, a indução de embriões haploides através da cultura de óvulos e ovários não polinizados é sem dúvida, a técnica de cultura de tecidos vegetais mais aplicada às espécies desse gênero afim de produção de plantas homozigóticas (haploide com posterior duplicação para todos os seus locos). Entre uma série de fatores que influenciam a indução e crescimento *in vitro* pode-se destacar: a composição genética da planta, suplementos adicionados ao meio de cultura e condições ambientais. A composição genética da planta depende da família que determina o tipo de explante que é mais comumente usados (ASCOUGH et al., 2008).

Os componentes do meio de cultura, tais como: formulação salina, reguladores de crescimento vegetal, hidratos de carbono, meio de geleificação e adição de outros novos

agentes podem ser ajustados para produção de haplóides ginogênicos em cebola (CAMPION et al., 1995a, b; BOHANEK et al., 1995; JAKŠE et al., 1996; MARTINEZ et al., 2000). Em comparação com fatores inerentes à fonte vegetal, as condições de cultivo têm sido de importância secundária nos experimentos de ginogênese da cebola, no entanto os protocolos mais bem sucedidos para a indução de haploides são aqueles em que a fonte vegetal e os fatores relacionados à cultura foram co-otimizados para a produção em larga escala de plântulas (MICHALIK et al., 2000).

Apesar das incertezas em torno das condições de origem da planta e da cultura de tecidos, as linhagens haploides e duplo haploide têm sido usadas com sucesso em programas convencionais de melhoramento de cebola e em estudos genéticos e genômicos (HYDE et al., 2012; KHOSA et al., 2016a, b) e a cebola é considerada um modelo experimental para o estudo da ginogênese *in vitro* em plantas (SEGUI-SIMARRO, 2015). A eficiência ginogênica foi testada em um número relativamente pequeno de genótipos de cebola de diferentes regiões geográficas do mundo (por exemplo, Eslovênia, Polônia, Espanha, Turquia, Argentina, EUA, Japão, Irã e Índia. Geofriau et al. (1997a) demonstraram frequências de indução mais altas em variedades do norte da Europa em comparação com variedades do sul e leste da Europa sendo essa frequência conseguida devido o uso dos fitorreguladores que são aditivos de meios de cultura essenciais para a embriogênese haploide, indução de calos e regeneração de plântulas.

### **Uso dos reguladores de crescimento na indução de haploides**

Os efeitos dos reguladores, dependem em parte de suas concentrações relativas e do meio basal utilizado. Citocinina BA: Benziladenina; 2-iP: (Isopentenyl adenina) purina e outros e auxina (2,4-D: ácido 2,4 diclorofenoxiático; NAA: ácido 1- naftalenoacético; IAA: ácido indol-3-acético; IBA: ácido indol-3-butírico e outros) são PGRs chave amplamente utilizados para o cultivo *in vitro* de gemas forais inteiras não polinizadas, ovários e óvulos (DONG et al., 2016) a citocinina (BA) e a auxina (2,4-D) são comumente usadas em combinação com ambas a 2,0 mg/l com concentrações mais altas levando à indução embrionária e concentrações mais baixas, resultando na formação de calos e diminuição da capacidade de resposta em botões forais (JAKŠE et al., 1996; YARALI & YANMAZ, 2017).

A indução de embriões ginogênicos usando meio MS suplementado com NAA (1,0 mg.L<sup>-1</sup>) e BA (2,0 mg.L<sup>-1</sup>) induziu mais efetivamente embriões ginogênicos em cebola, de acordo com Campion et al., (1992) relatando rendimentos mais elevados do que Muren (1989). Além disso, combinações de NAA e 2-iP parecem robustas em relação ao genótipo, induzindo efetivamente a embriogênese em cultivares de cebola polonesa, espanhola e indiana

(MICHALIK et al., 2000a; FAYOS et al., 2015; MATHAPATI et al., 2018).

A alta eficácia embriogênica das auxinas, especificamente do 2,4-D, pode ser consequência do duplo papel exercido por esse regulador, uma vez que, se porta como uma auxina, agindo de forma direta ou modificando o metabolismo intracelular de auxinas endógenas (FEHÉR; PASTERNAK; DUDITS, 2003; KIKUCHI et al., 2006); por outro lado, o 2,4-D também se configura como um agente estressor (BHAT et al., 2015; NIC-CAN; LOYOLA-VARGAS, 2016). Segundo Karami e Said (2010), quando auxinas exógenas são aplicadas, elas se comportam mais como agentes estressores do que reguladores propriamente ditos, questão sustentada pela expressão compartilhada de genes em resposta a auxinas e a diferentes estresses abióticos.

Outra classe de reguladores de crescimento, as poliaminas, também tem proporcionado bons resultados em trabalhos de embriogênese em *Allium cepa* L como em (Ebrahimi & Zamani, 2009), ou em meios contendo Spd (0,5 mM) combinado com outros reguladores de crescimento (FORODI et al., 2009). Vários autores também relatam efeitos positivos da aplicação exógena de poliaminas nas várias fases da embriogênese em espécies de outras famílias botânicas, como em *Panax ginseng* (KEVERS et al., 2000), *Daucus carota* (TAKEDA et al., 2002), *Momordica charantia* (PAUL; MITTER; RAYCHAUDHURI, 2009), *Brassica napus* (AHMADI et al., 2014), *Gossypium hirsutum* (CHENG et al., 2015), *Saccharum* sp. (REIS et al., 2016) e *Oryza sativa* (TAN et al., 2017).

Poliaminas (PAs) como espermidina (Spd), putrescina (Put) e espermina (Spe) são compostos de baixo peso molecular que afetam todos os aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas. Os PAs ocorrem naturalmente em altas concentrações em flores e outros órgãos (TIBURCIO et al., 2014) e em meios de cultura, também são conhecidos por participarem da regulação da embriogênese gamética dos quais frequentemente têm efeitos negativos na cultura de tecidos (SOLORZANO-CASCANTE et al., 2018).

As putrescinas tem aumentado a porcentagem de micrósoros multinucleados, o número médio de calos androgênicos e indução de embriões em cultivares de citros MAR e 'Nules' (Chiancone et al., 2015). Poliaminas (PAs) como espermidina (Spd), putrescine (Put), espermina (Spe) e cadavarina (Cad) em análise de ovários de cebolas não fertilizados demonstram as frequências ginogênicas mais altas (GEOFRIAU et al., 2006). Spd combinado com níveis relativamente baixos de Put melhorou as frequências de indução e regeneração em cebola (GEOFRIAU et al., 2006), enquanto o uso de Put sozinho não estimulou a regeneração em três cultivares argentinas recalcitrantes (PONCE et al., 2006).

Os efeitos fisiológicos das poliaminas na embriogênese somática ainda continuam

pouco elucidados (CHENG et al., 2015; REIS et al., 2016), sendo comumente relacionados à divisão celular (PAUL; MITTER; RAYCHAUDHURI, 2009) e rápido crescimento (KACKAR; SHEKHAWAT, 2007), alongamento celular e desenvolvimento de centros meristemáticos (CVIKROVÁ et al., 1998), e ainda proteção contra o ambiente estressante *in vitro* (REIS et al., 2016).

Essa versatilidade de fatores indutivos pode ser parcialmente explicada pela interação da condição indutiva com os níveis endógenos de hormônios nos explantes (JIMÉNEZ, 2001; JIMÉNEZ, 2005).

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, Camila Camargo et al. Análise das características da agricultura familiar no município de Erval Velho, SC. **Unoesc & Ciência-ACSA**, v. 8, n. 1, p. 15-24, 2017.
- AHMADI, Behzad; EBRAHIMZADEH, Hamed. In vitro androgenesis: Spontaneous vs. artificial genome doubling and characterization of regenerants. **Plant cell reports**, v.39, n. 3, p. 299-316, 2020.
- ALAN, Ali R. et al. Fecund gynogenic lines from onion (*Allium cepa* L.) breeding materials. **Plant science**, v. 167, n. 5, p. 1055-1066, 2004.
- ALAN, Ali 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.
- ALMEIDA CANÇADO, Geraldo Magela et al. Cultivo de plantas in vitro e suas aplicações. **Informe Agropecuário, Belo Horizonte**, v. 30, n. 253, p. 64-74, 2009.
- ASCOUGH, Glendon D.; VAN STADEN, Johannes; ERWIN, John E. In vitro storage organ formation of ornamental geophytes. **Horticultural Reviews-Westport Then New York-**, v. 34, p. 417, 2008.
- BHAT, Supriya V. et al. Rhizobium leguminosarum bv. viciae 3841 adapts to 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid with “auxin-like” morphological changes, cell envelope remodeling and upregulation of central metabolic pathways. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0123813, 2015.
- BOEING, Guido. **Fatores que afetam a qualidade da cebola na agricultura familiar catarinense**. Instituto Cepa-SC, 2002.
- BOHANEK, Borut et al. Doubled-haploid onions. **Allium crop science: recent advances**, v. 145, p. 157, 2002.
- BOHANEK, Borut et al. Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.): induction procedures and genetic analysis of regenerants. **Plant Science**, v. 104, n. 2, p. 215-224, 1995.
- BORÉM, Aluizio; MIRANDA, Glauco V.; FRITSCHÉ-NETO, Roberto. **Melhoramento de plantas**. Oficina de Textos, 2021.
- CAMPION, B.; BOHANEK, B.; JAVORNIK, B. Gynogenic lines of onion (*Allium cepa* L.): evidence of their homozygosity. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, n.4, p. 598-602, 1995.
- CANÇADO, Geraldo Magela de Almeida et al. Avaliação de nove linhagens de milho em cruzamentos dialélicos quanto à tolerância ao alumínio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 471-478, 2002.
- CHENG, Wen-Han et al. Polyamine and its metabolite H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> play a key role in the conversion of embryogenic callus into somatic embryos in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.).

**Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1063, 2015.

CHIANCONE, Benedetta et al. Early embryo achievement through isolated microspore culture in *Citrus clementina* Hort. Ex Tan., cvs. 'Monreal Rosso' and 'Nules'. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 413, 2015.

COSTA, Nivaldo Duarte. Manejo cultura da cebola. In: Embrapa Semiárido Artigo em anais de congresso (ALICE). In: SEMANA ITINERANTE PROJETO

COSTA, Nivaldo Duarte; DE RESENDE, Geraldo Milanez. Cultivo da cebola no Nordeste. Embrapa Semiárido-Sistema de Produção (INFOTECA-E), 2007.

DUNWELL, Jim M. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. **Plant biotechnology journal**, v. 8, n. 4, p. 377-424, 2010.

EBRAHIMI, R.; ZAMANI, Z. Effect of polyamines on in vitro gynogenesis of onion (*Allium cepa* L.). **Am Eurasian J Sustain Agric**, v. 3, n. 1, p. 71-74, 2009.

ELLIS, David et al. Cryopreservation of 12 *Allium sativum* (garlic) Accessions: a Comparison of Plant Vitrification Solutions (PVS2 and PVS3). **Vitro-Cellular and Developmental Biology-Plants**, p. 11-12, 2005.

EPAGRI. 2000. Sistema de produção para cebola: Santa Catarina (3a. Revisão). Florianópolis: 2000. 91 p. (Epagri. Sistemas de Produção, 16).

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.

FEHER, Attila; PASTERNAK, Taras P.; DUDITS, Denes. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 74, n. 3, p. 201-228, 2003.

FÉRÉOL, Léonidas et al. 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.

FILGUEIRA, Fernando Antonio Reis. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3ed. Viçosa: UFV, 2008. 421p.

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.

DE FRANCA, J. G. E.; CANDEIA, J. A. Development of short-day yellow onion for tropical environment of the Brazilian northeast. In: **I International Symposium on Edible Alliaceae 433**. 1994. p. 285-290.

FRITSCH, R. M. et al. Evolution, domestication and taxonomy. **Allium crop science: recent advances**, p. 5-30, 2002.

GEOFFRIAU, Emmanuel; KAHANE, R.; RANCILLAC, M. Variation of gynogenesis ability

in onion (*Allium cepa* L.). **Euphytica**, v. 94, n. 1, p. 37-44, 1997.

GOLDMAN; HAVEY MJ; SCHROECK G. 2000. History of public onion breeding programs and pedigree of public onion germplasm releases in the United States. **Plant Breeding Reviews**, 20: p.67-103, 2000.

HYDE, Peter T.; EARLE, Elizabeth D.; MUTSCHLER, Martha A. Doubled haploid onion (*Allium cepa* L.) lines and their impact on hybrid performance. **HortScience**, v.47, n. 12, p. 1690-1695, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Produção agrícola municipal. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 22 de agosto de 2022.

IPGRI, Ecp; GR, Avrdc. Descriptors for *Allium* (*Allium* spp.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy; European Cooperative Programme for Crop Genetic Resources Networks (ECP/GR), **Asian Vegetable Research and Development Center**, Taiwan. Rome. p 45. 2001.

JAKŠE, Marijana; BOHANEK, Borut; IHAN, Alojz. Effect of media components on the gynogenic regeneration of onion (*Allium cepa* L.) cultivars and analysis of regenerants. **Plant Cell Reports**, v. 15, n. 12, p. 934-938, 1996.

JIMÉNEZ, Víctor M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. **Plant growth regulation**, v. 47, n. 2, p. 91-110, 2005.

JONES, H. A.; MAN, L. K. Onion and their allies. New York: **Interscience**, 1963. 283p.

KARAMI, Omid; SAIDI, Abbas. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. **Molecular biology reports**, v. 37, n. 5, p. 2493-2507, 2010.

KENEL, Fernand; EADY, Colin; BRINCH, Sheree. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and regeneration of garlic (*Allium sativum*) immature leaf tissue. **Plant cell reports**, v. 29, n. 3, p. 223-230, 2010.

KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas ‘in vitro’: uma realidade. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v.1, n.1, p.30-33, maio 1997.

KEVERS, Claire et al. Somatic embryogenesis of *Panax ginseng* in liquid cultures: a role for polyamines and their metabolic pathways. **Plant growth regulation**, v. 31, n. 3, p. 209-214, 2000.

KHAN, Patan Shaik Sha Valli et al., Doubled haploid production in onion (*Allium cepa* L.): from gynogenesis to chromosome doubling. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 142, n. 1, p. 1-22, 2020.

KHOSA, Jiffinvir S. et al. Doubled haploid ‘CUDH2107’ as a reference for bulb onion (*Allium cepa* L.) research: development of a transcriptome catalogue and identification of transcripts associated with male fertility. **PLoS one**, v. 11, n. 11, p. e0166568, 2016.

KHOSA, Jiffinvir S. et al. Enhancing onion breeding using molecular tools. **Plant Breeding**,

v. 135, n. 1, p. 9-20, 2016.

KIKUCHI, Akira et al. Abscisic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. **Planta**, v. 223, n. 4, p.637-645, 2006.

KISHOR, Saurabh et al. Effect of spacing and different cultivars on gridgeth and yield of onion (*Allium cepa* L.) under Lucknow conditions. **Int. J. Pure Appl. Biosci**, v. 5, n.4, p. 612-616, 2017.

KNUDSON, Lewis. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. **Botanical gazette**, v.73, n. 1, p. 1-25, 1922.

KRIKORIAN, A.D.; BERQUAM, D.L. Plant cell and tissue culture: the role of Harbe-landt. *The Botanical Review*, New York, v.35, n.2, p.59-88, 1969.

KUMAR, A. et al. Seasonal incidence of major insect pests of onion in relation to biotic and abiotic factors. **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences**, v. 6, n. 1, p. 201-205, 2017.

LAGO DE SOBRADINHO, I., 2014, Petrolina. Palestras... Petrolina: EmbrapaSemiárido, 2014.FEHÉR, Attila. Plant Somatic Embryogenesis: Some Useful Considerations.**Biochimica et Biophysica Acta**, pag. 385-402, 2015.

LEITE, Daniela Lopes et al. Melhoramento genético de cebola para as condições tropicais e subtropicais do Brasil. 2009.

LEITE, Daniela Lopes et al. Melhoramento genético de cebola para as condições tropicais e subtropicais do Brasil. 2009.

MARCUZZO, Leandro Luiz; KOTKOSKI, Bruna. Caracterização da epidemiologia temporal e espacial da queima das pontas das folhas da cebola. **Summa Phytopathologica**, v. 46, p. 167-170, 2020.

MARTINEZ, Liliana E. et al. Improvement of in vitro gynogenesis induction in onion (*Allium cepa* L.) using polyamines. **Plant Science**, v. 156, n. 2, p. 221-226, 2000.

MATHAPATI, Gururaj Basaya et al. Influence of culture media and their composition on haploid induction in Indian short day onion. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 89, n. 2, p. 739-746, 2019.

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

NIC-CAN, Geovanny I.; LOYOLA-VARGAS, Víctor M. The role of the auxins during somatic embryogenesis. In: **Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications**. Springer, Cham, 2016. p. 171-182.

OLIVEIRA VR; BOITEUX LS. Cultivo da Cebola. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, (Sistema de Produção). 2004

PASTRO, G. 2015. Bulbo, rizoma, raíz ou tubérculo? Disponível em: <https://viveirosabordefazenda.wordpress.com>. Acesso em: 22 de agosto de 2022.

PONCE, M.; MARTINEZ, Liliana; GALMARINI, C. Influence of CCC, putrescine and gellam gum concentration on gynogenic embryo induction in *Allium cepa*. **Biologia plantarum**, v. 50, n. 3, p. 425-428, 2006.

RABINOWITCH, H. D., & BREWSTER, J. L. (Eds.). (2022). *Onions and Allied Crops: 3 volume set*. Taylor & Francis.

REIS, Effect; BATISTA, M. T.; CANHOTO, J. M. Effect and analysis of phenolic compounds during somatic embryogenesis induction in *Feijoa sellowiana* Berg. **Protoplasma**, v. 232, n. 3, p. 193-202, 2008.

SACCHET, A. M. O. F. Variabilidade genética: ponto de partida para o melhoramento de plantas. In: SACCHET, A. M. O. F. (Org.). *Genética para que te quero?* Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1999. p. 99-104.

SALGADO, Fernanda Ferreira; DA SILVA SOUZA, Emanuelle Taís; CARNEIRO, Andréa Almeida. Embriogenese somática e regeneração em cultura de tecidos de linhagens de milho tropical. **Revista Brasileira de Ciências da Vida**, v. 5, n. 1, 2017.

SEGUI SAMARRO, JM. Reproductive biology and plant biotechnology. (Valencia, Spain: Editorial Polytechnic University of Valencia). 2010.

SEGUI-SIMARRO JM. Editorial: doubled haploidy in model and recalcitrant species. *Front Plant Sci* 6:1175. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01175>. 2015.

SEGUI-SIMARRO, JM. Androgenesis revisited. *Robot. Rev.* 76, 377-404. 2010.

SEGUÍ-SIMARRO, JM AND NUEZ, F. How microspores turn into haploid embryos: changes associated with induction of embryogenesis and microspore-derived embryogenesis. *Physiological To plant*. 134, 1-12. 2008.

SOLÓRZANO-CASCANTE, Paúl; SÁNCHEZ-CHIANG, Neiva; JIMÉNEZ, Víctor M. Explant type, culture system, 6-benzyladenine, meta-topolin and encapsulation affect indirect somatic embryogenesis and regeneration in *Carica papaya* L. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1769, 2018.

TAKEDA, Toshiya et al. Effects of exogenous polyamines on embryogenic carrot cells. **Biochemical engineering journal**, v. 12, n. 1, p. 21-28, 2002.

TAN, Yan Ping et al. Polyamine plays a role in subculture growth of in vitro callus of indica rice. **Acta Biologica Cracoviensia s. Botanica**, v. 59, n. 1, 2017.

TIBURCIO, Antonio F. et al. The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress. **Planta**, v. 240, n. 1, p. 1-18, 2014.

VALENCIO, AGRB et al. Estabelecimento de um banco de caracteres botânicos e agronômicos de populações de cebola suaves/doces. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. sSuplemento, 2004.

VAVILOV, N.I. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. In: *Onion And Their Allies: Botany, Cultivation and Utilization*. (eds.). Leonard Hill Books. London, 1963. 286p.

VIEIRA, R. L., SILVA, A. L. D., ZAFFARI, G. R., & FELTRIM, A. L. (2014). Morfogênese de plantas de alho in vitro: papel dos reguladores de crescimento na indução e desenvolvimento de bulbos. *Ciência Rural*, 44, 439-445.

VIEIRA, Renato Luis et al. Morfogênese de plantas de alho in vitro: papel dos reguladores de crescimento na indução e desenvolvimento de bulbos. *Ciência Rural*, v.44, p. 439-445, 2014.

WEDZONY, M., FORSTER, BP, ZUR, I., GOLEMIEC, E., SZECHYNSKA-HEBDA, M., DUBAS, E. Ovário não polinizado de *Nicotiana tabacum* cultivado in vitro. *ActaBot. Sem. 23. Theor Appl Genet* 63, 97-104.

WENDELBO, P. Alliaceae. In: RECHINGER, K.H., (Eds.). *Flora Iranica. Austria: Graz*, p.76-100, 1971.

YARALI F, YANMAZ R (2017). The effects of plant growth regulators on in vitro gynogenic embryo formation in onion (*Allium cepa* L.). *Afr J Biotechnol* 16:1977–1983.

YURI, Jony Eishi; COSTA, Nivaldo Duarte; DE RESENDE, Geraldo Milanez. Características produtivas de cultivares de cebola no Submédio do Vale do São Francisco. 2019.

## **CAPÍTULO I: Indução de embriões ginogênicos em cebola a partir de botões florais não fertilizados**

### **RESUMO**

O uso de haploide e duplo haploide no melhoramento de cebola (*Allium cepa* L.) é sem dúvida uma das melhores alternativas para o melhoramento genético de cebola otimizando tempo e custo por meio da técnica de obtenção de embriões ginogênicos. O objetivo deste trabalho foi testar a capacidade ginogênica de variedades de cebola por meio de botões florais não fertilizados, em meio de cultura BDS suplementado com reguladores de crescimento vegetal. Utilizou-se botões não fertilizados da variedade IPA-11 e BRS Alfa São Francisco que foram inoculados em meio de cultura BDS, sendo inoculados 20 botões florais não fertilizados em placa de Petri por 120 dias, os calos, bulbos, brotos e plântulas formados foram transferidos para meio MS meia força, suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de AIB + 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de KIN. Após 3 - 4 semanas, as plântulas foram transferidas para vasos com substrato comercial PlantMax<sup>®</sup> para aclimatização. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3<sup>2</sup>, os tratamentos consistiram na combinação de doses 0, 1.0 e 2.0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D e 0, 1.0 e 2.0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, totalizando assim 9 tratamentos, com 7 repetições cada. As variáveis analisadas foram: Indução de bulbo formados; número de embriões formados; número de calos formados; diâmetro do calo; número de folhas; comprimento da folha principal; comprimento da raiz principal; número de calos formados por variedade; número de embriões formados por variedade; número de plântulas albinas formada por variedade; porcentagem de calo por variedade; porcentagem de embriões por variedade; porcentagem de plantas albinas por variedade; porcentagem de calo formado por tratamento e porcentagem de embriões formados por tratamento. Os dados foram submetidos a análise de variância e quando houve diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo teste Scott Knott ao nível de 5% de probabilidade. A partir dos botões inoculados 1.427 formaram calos, 203 formaram plântulas e 3 foram plântulas albinas. O nível de ploidia foi determinado por análise citogenética confirmando o número de cromossomos das plântulas regeneradas 2n = 16 cromossomos. Os tratamentos mais responsivos tem em sua composição 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, essas duas cultivares apresentam capacidade de duplicação cromossômica espontânea ou seja sem uso de antimetabólito sendo elas ideais para produção de plantas haploides e produção de híbridos.

**Palavras-chave:** haploides; ploidia; embriogênicos.

## Induction of gygenic embryos in onion from unfertilized flower buds

### ABSTRACT

The use of haploid and double haploid in the improvement of onion (*Allium cepa* L.) is undoubtedly one of the best alternatives for the genetic improvement of onion, optimizing time and cost through the technique of obtaining gynogenesis embryos. The objective of this work was to test the gygenic capacity of onion varieties by means of unfertilized flower buds, in BDS culture medium supplemented with plant growth regulators. were inoculated in BDS culture medium, being inoculated 20 non-fertilized flower buds in a Petri dish for 120 days, the calluses, bulbs, buds and seedlings formed were transferred to half-strength MS medium, supplemented with  $1.0 \text{ mg.L}^{-1}$  of AIB +  $1.0 \text{ mg.L}^{-1}$  of KIN. After 3-4 weeks, the seedlings were transferred to pots with commercial PlantMax® substrate for acclimatization. The experiment was conducted in a completely randomized design, in a 32 factorial scheme, the treatments consisted of a combination of doses of 0; 1.0 and  $2.0 \text{ mg.L}^{-1}$  of 2,4-D and 0, 1.0 and  $2.0 \text{ mg.L}^{-1}$  of BAP, thus totaling 9 treatments, with 7 repetitions each. The analyzed variables were: Induction of formed bulb; number of embryos formed; number of calluses formed; callus diameter; number of leaves; length of the main leaf; length of the main root; number of callus formed per variety; number of embryos formed per variety; number of albino seedlings formed per variety; percentage of callus by variety; percentage of embryos by variety; percentage of albino plants by variety; percentage of callus formed per treatment and percentage of embryos formed per treatment. Data were submitted to analysis of variance and when there were significant differences, means were compared using the Scott Knott test at a 5% probability level. Apart from the inoculated buds, 1,42 formed calluses, 203 formed seedlings and 3 were albino seedlings. The level of ploidy was determined by cytogenetic analysis confirming the chromosome number of regenerated seedlings  $2n = 16$  chromosomes. The most responsive treatments have in their composition  $2.0 \text{ mg.L}^{-1}$  of 2,4-D +  $2.0 \text{ mg.L}^{-1}$  of BAP, these two cultivars have the capacity for spontaneous chromosome duplication, that is, without the use of antimetabolic and they are ideal for the production of haploid plants and production of hybrids

**Keywords:** haploid; ploidy; embryogenesis.

## 1 INTRODUÇÃO

A cebola (*Allium cepa* L.) é uma cultura importante economicamente em todo o mundo, e é utilizada para diversos fins, consumo *in natura*, erva medicinal e condimentar (ALAN et al., 2016). É a terceira hortaliça de maior importância econômica do Brasil com uma área plantada de 47.504 hectares, seu maior produtor é o Estado de Santa Catarina (YURI et al., 2019, IBGE, 2020).

A produção e o consumo de cebola vem aumentando em todo o mundo e os melhoristas estão tentando desenvolver novas variedades híbridas com as características agronômicas desejadas alta produtividade, resistência a patógenos, à seca, precocidade entre outras (SANTOS et al., 2018). A cebola apresenta alta tendência de cruzamento em função da incompatibilidade gametofítica e exibe grave depressão por endogamia quando autopolinizada, o desenvolvimento endogâmico por meio de técnicas clássicas de melhoramento é muito difícil nesta cultura (CELEBI et al., 2021).

O uso de cultivares híbridas vem despertando maior interesse pelos produtores de cebola devido à superioridade agronômica em comparação com outras cultivares de polinização aberta (ALAN et al., 2016). A produção de híbridos é uma prática demorada e trabalhosa ao se utilizar o melhoramento convencional, devido ao tempo de obtenção de um híbrido de cebola. Quando utiliza-se do cultivo *in vitro* se tem um ganho de tempo na produção de híbridos, ao utilizar a técnica de ginogênese em cultura de tecidos, uma alternativa para o desenvolvimento de plantas haploides, seguidas de duplicação de cromossomos que irá oferecer linhas puras e resolverão as limitações para futuros cruzamentos (SULISTYANINGSIH et al., 2006; GARCÍA FORTEA, 2017).

A maior desvantagem da técnica de ginogênese na cebola são as baixas taxas de indução de embriogênese, sobrevivência das plantas e duplicação de cromossomos na maioria das vezes que é estudado. Precisa-se ser considerado que para alcançar altas frequências de ginogênese alguns aspectos, como genótipo, condições de crescimento de plantas doadoras, meios de produção *in vitro* e reguladores de crescimento de plantas suplementares, são os principais fatores efetivos (ANANDHAN et al., 2014; MISHRA & GOSWAMI, 2014).

A ausência de reguladores de crescimento permite a formação de haploide, mas com uma frequência muito baixa (BEKHEE et al., 2004). Sendo necessária a combinação de reguladores de crescimento auxinas e citocininas, principalmente 2,4-D e BAP (CAMPION et al., 1992; CAMPION et al., 1995).

Portanto dentro desse contexto este trabalho teve como objetivo deste trabalho foi testar a capacidade ginogênica de variedades de cebola por meio de botões florais não fertilizados, em meio de cultura BDS suplementado com reguladores de crescimento vegetal.

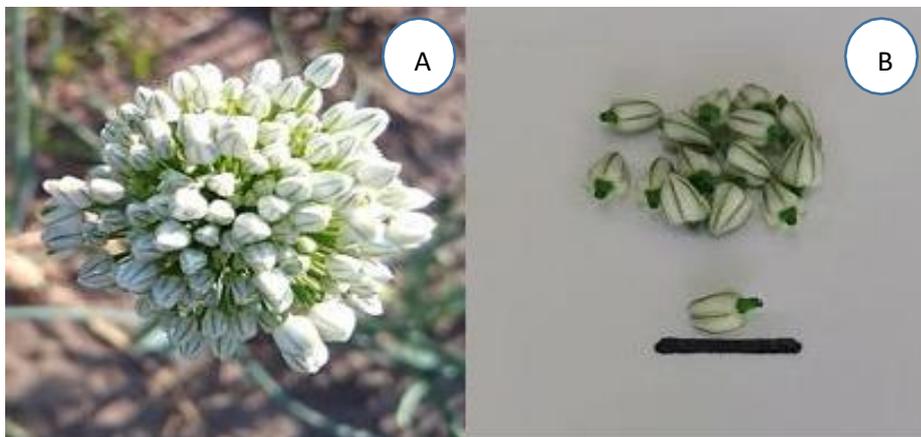
## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal localizado no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Areia-PB.

### 2.2 Material vegetal

Utilizou-se bulbos vernalizados de cebola (*Allium cepa* L.) da variedade IPA-11 e BRS Alfa São Francisco, sendo que a variedade BRS Alfa São Francisco só foi iniciadoo teste de indução um ano após o início do experimento com a variedade IPA 11, ambas doadas pelo Instituto de Agrônômico de Pernambuco (IPA). Os bulbos vernalizados foram plantados em casa de vegetação no setor de biotecnologia quando as plantas emitiram as inflorescências, foram coletadas próximo da antese (Figura 1A) armazenadas em caixa de isopor e acondicionadas em freezer (4 - 8°C) para manterem a capacidade ginogênica por pelo menos um dia e no máximo uma semana (LONGO et al., 2013). Utilizou-se umbelas fechadas com botões florais grandes medindo 7,0 mm e pesando 0,04 g e botões médios medindo 4mm e pesando 0,03g (Figura 1B).



**Figura 1.** Umbela de cebola (*Allium cepa* L.) em campo no estágio próximo da antese (A). Botões florais selecionados que irão ser inoculados (B). Barra 1cm. (Fonte: RODRIGUES, C.A.P.S).

### 2.3 Desinfestação dos botões florais

Em fluxo laminar, foi realizada a desinfestação dos botões florais com 100 ml de álcool 70% por 3 minutos, em seguida colocados 100 ml solução de hipoclorito de sódio(2%

de cloro ativo) adicionando-se 3 gotas de Tween 20, permanecendo imersos nesta solução por 15 min. Os botões foram lavados três vezes em água destilada e deionizada e autoclavada (DDA).

O meio utilizado para a indução dos embriões foi derivado do meio B5 (GAMBORG et al., 1968) e desenvolvido por DUNSTAN & SHORT (1977), o meio denominado BDS, o qual foi suplementado com  $100\text{g.L}^{-1}$  de sacarose como fonte de carboidratos (MUREN, 1989; BOHANEK & JAKSE, 1999; JUDKEVIEIENE et al.,

2005; MUSIAL et al., 2005). Os meios de cultura tiveram o pH ajustado para 5,8 antes de adicionar  $7\text{g.L}^{-1}$  de ágar em seguida o meio foi esterilizado em autoclave à temperatura de  $120^{\circ}\text{C}$  e pressão de  $1\text{ kgf/cm}^{-2}$  durante 15min. Foram acrescentados ao meio os reguladores diclorofenoxiacético (2,4-D) e 6-benzilaminopurina (BAP), de acordo com o protocolo descrito por (YARALI et al., 2017), com doses variando de 1 a  $2\text{mg.L}^{-1}$  para ambos os reguladores formando um total de 9 tratamento T1 =  $0\text{ mg.L}^{-1}$  de BAP +  $0\text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D; T2 =  $0\text{ mg.L}^{-1}$  de BAP +  $1,0\text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D; T3 =  $0\text{ mg.L}^{-1}$  de BAP +  $2,0\text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D; T4 =  $1,0\text{ mg.L}^{-1}$  de BAP +  $0\text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D; T5 =  $1,0\text{ mg.L}^{-1}$  de BAP +  $1,0\text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D; T6 =  $1,0\text{ mg.L}^{-1}$  de BAP +  $2,0\text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D; T7 =  $2,0\text{ mg.L}^{-1}$  de BAP +  $0\text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D; T8 =  $2,0\text{ mg.L}^{-1}$  de BAP +  $1,0\text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D; T9 =  $2,0\text{ mg.L}^{-1}$  de BAP +  $2,0\text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D.

Os botões florais desinfestados foram inoculados em placas de petri descartáveis de 90 por 15 mm, contendo 25 ml do meio de cultura BDS. Em cada placa foi colocado 20 botões fechados não fertilizados. As placas com os botões foram transferidas para sala de crescimento, mantidos sob controle de temperatura, 8 horas a  $27^{\circ}\text{C}$  no claro e 16 horas a  $24^{\circ}\text{C}$  no escuro.

Os botões foram mantidos no meio de indução (BDS) por um período de até 120 dias, com repicagens periódicas a cada 30 dias. Durante os intervalos de 30 dias, quando detectada a presença de embriões ginogênicos, estes eram coletados e transferidos para meio de regeneração, conforme sugerido por Jakše et al. (1996) e Martinez et al. (2000).

#### **2.4 Meio de Regeneração**

A cada 30 dias da inoculação no meio de indução, os embriões eram transferidos para potes de vidro contendo o meio de regeneração MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido de  $30\text{ g.L}^{-1}$  de sacarose, com a adição de  $7,0\text{ g.L}^{-1}$  ágar suplementado com  $1\text{ mg.L}^{-1}$  de Kin (Cinetina) e  $1\text{ mg.L}^{-1}$  de ácido indol-butírico (AIB), substituindo o meio a cada 30 dias.

## 2.5 Aclimatização das plântulas regeneradas

As plântulas foram retiradas dos potes de vidro, lavadas com água DDA, para retirar o excesso de meio de cultura e transferidas para copos plásticos contendo água DDA. Os copos descartáveis foram cobertos com sacos plásticos fixados com um elástico de borracha e mantidos no laboratório a  $26^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Após 24hrs, a água foi retirada e os recipientes preenchidos com substrato comercial Plantmax<sup>®</sup> e vermiculita (1:1) e novamente recobertos com saco plástico. Após 48 horas os sacos plásticos foram retirados e as plântulas mantidas em laboratório em temperatura ambiente e luz natural. Após um mês as plântulas foram transplantadas para vasos de 11 cm de diâmetro com o mesmo substrato.

## 2.6 Níveis de ploidia

Para a análise citogenética, pontas de raízes de *Allium cepa* foram coletadas e pré-tratadas com 8Hq por 24h a  $10^{\circ}\text{C}$  e posteriormente, foram fixadas em solução Carnoy (3:1, etanol: ácido acético) por 2h a temperatura ambiente e estocadas em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ . No preparo das lâminas, o material foi lavado em água destilada e digerido com uma solução enzimática contendo 2% celulase (Onozuka) e 20% pectinase (Sigma) (w/v) por 20 minutos em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, as lâminas foram preparadas pelo método de esmagamento em ácido acético 60%, e as lamínulas retiradas em nitrogênio líquido. Em seguida, as lâminas foram secas ao ar e envelhecidas por três dias à temperatura ambiente (GUERRA & SOUZA, 2002).

Após o envelhecimento, as lâminas foram coradas com os fluorocromos CMA/DAPI conforme Barros, Silva & Guerra (2010), com pequenas modificações. As lâminas foram coradas com 10  $\mu\text{L}$  CMA (Cromomicina A3) (0,1 mg/ml) durante 60 minutos, com lamínulas retiradas em água destilada, secas ao ar. Em seguida, coradas com 10  $\mu\text{L}$  de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) com meio de montagem glicerol e tampão McIlvaine (pH 7,0) (1:1, v/v) e estocadas em câmara escura a temperatura ambiente por no mínimo três dias. As melhores metáfases foram fotografadas em fotomicroscópio Zeiss com câmera de vídeo Axio Cam MRC5 usando o software Axiovision 4.8.

## 2.7 Caracterização

Foram realizadas repicagens no mesmo meio de regeneração a cada 30 dias onde foram realizadas as avaliações, quanto a indução de bulbo formados (IBF), número de embriões formados (NEM), número de calos formados (NCF), diâmetro do calo (DC) cm, número de folhas (NF), comprimento da folha principal (CFP) cm, comprimento da raiz principal (CRP) cm, número de calo formado por variedade (NCFV), número de embriões

formados por variedade (NEFPV), número de plântulas albinas formada por variedade (NPAV), porcentagem de calo por variedade (%CV), porcentagem de embriões por variedade (%EMV), porcentagem de plantas albinas por variedade (%PABV) porcentagem de calo formado por tratamento (%NCFT) e porcentagem de embriões formados por tratamento (%NEFT).

As equações 1, 2, 3, 4 e 5 foram utilizadas para calcular as porcentagens das seguintes variáveis: calos por variedade, embriões por variedade, plantas albinas por variedade, calo formado por tratamento e embriões formados por tratamento.

$$\%NCFV = (NCFV/NBV) \times 100 \quad \text{Eq.1}$$

Em que: porcentagem de número de calos formados por variedade %NCFV = número de calos formados por variedade NCFV e NBV= número de botões viáveis.

$$\%EMFV = (NEMV/NBV) \times 100 \quad \text{Eq.2}$$

Em que: porcentagem de número de embriões formados por variedade % EMFV= número de embriões formados por variedade NEMV e NBV número de botões viáveis.

$$\%PAV = (NPAV/NBV) \times 100 \quad \text{Eq.3}$$

Em que: porcentagem de número de plantas albinas formadas por variedade % PAV= número de plantas albinas formadas por variedade NPAV e NBV= Número de botões viáveis.

$$\%NCFT = (NCFT/NEi) \times 100 \quad \text{Eq.4}$$

Em que: Porcentagem de calo formado por tratamento %NCFT= número de calo formado por tratamento NCFT e NEi= Número de explantes inoculado.

$$\%EMT = (NEMFT/NEi) \times 100 \quad \text{Eq.5}$$

Em que: Porcentagem de embriões formado por tratamento %EMT= número de embriões formado por tratamento NEMFT e NEi= Número de explantes inoculado.

## 2.8 Análise estatística

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (3<sup>3</sup>), para a variedade IPA-11 onde utilizou-se dois hormônios (BAP e 2,4D) em três concentrações (0,0; 1,0 e 2,0 mg.L<sup>-1</sup>), e duas cultivares (IPA-11 e BRS Alfa São Francisco), formando um total de 9 tratamentos por cultivar, obtidos por combinações de doses de hormônio. Cada tratamento foi repetido sete vezes, cada placa contendo 20 botões constituiu uma repetição, os dados foram

submetidos à análise de variância e reagrupamento de médias pelo teste de Scott knot, utilizou-se o programa computacional R Studio.

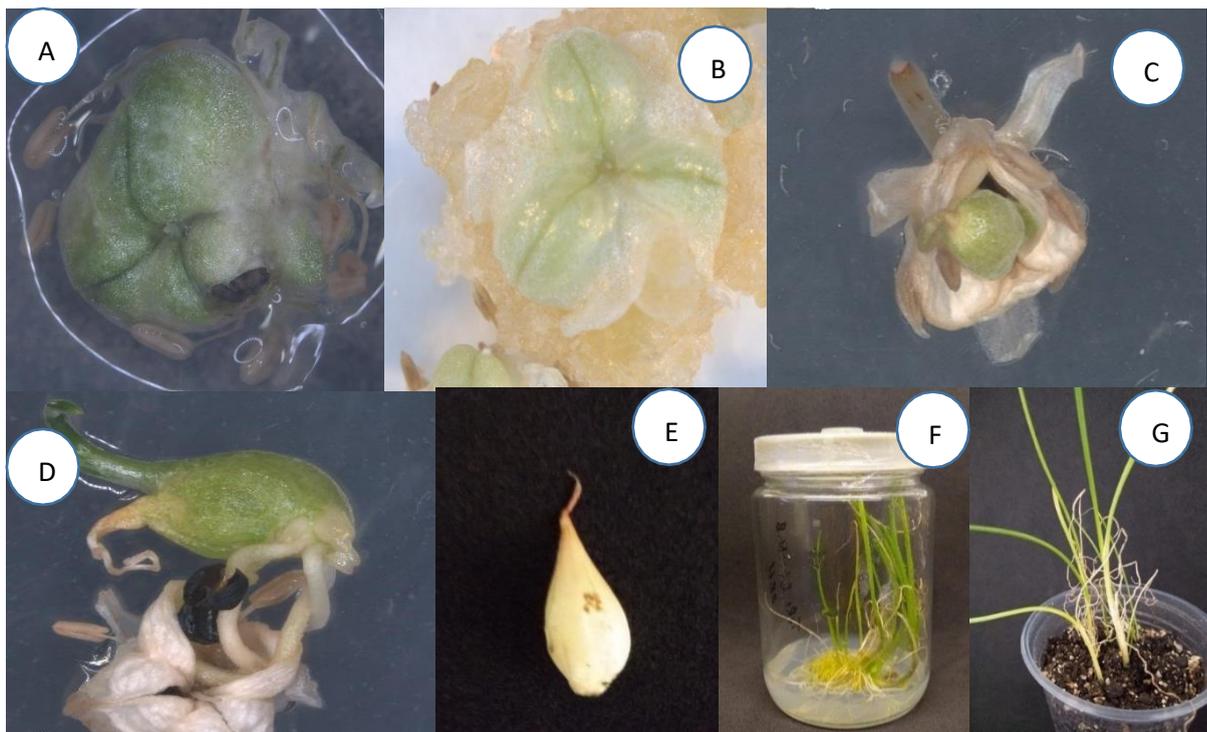
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inoculou-se um total de 36.000 botões florais das duas cultivares de cebola (IPA-11 e BRS Alfa São Francisco), dos quais, 9.600 botões florais eram viáveis (Fig.2A) os quais eram caracterizado devido o crescimento e desenvolvimento do saco embrionário (GUHA & JOHRI, 1966). Após um período de seis a oito dias de cultivo os botões florais das duas cultivares, tem-se a abertura dos botões dentro das placas de Petri.

Observou-se também, desenvolvimento de calos na base dos botões florais após a inoculação no período de 30 a 40 dias para a cultivar IPA-11 e 30 a 55 dias para a cultivar BRS Alfa São Francisco, (Fig.2B) sendo uma das desvantagens a utilização de botões inteiros na indução de embriões ginogênicos, pois os calos podem estar ligados a presença de pétalas, sépalas e nectários que são inoculados junto (LONGO et al., 2013). Aos 75 a 150 dias de cultivo a variedade IPA-11 apresentou a formação de embriões ginogênicos induzidos diretamente dos óvulos, rompendo a parede do ovário, enquanto para a variedade BRS Alfa São Francisco tem a formação de embriões aos 75 a 180 dias de inoculados, resultado esperado que aconteça para todas os botões, que seja a indução diretamente do ovário porque assim tem-se uma maior confiabilidade da planta obtida ser haploide, visto que quando se tem a formação de calo tem-se uma maior probabilidade que o embrião não tenha sido formado diretamente das estruturas embrionárias cujo tecido seja haploide (Fig.2C). A formação de sementes ainda na placa de Petri também foi observado nesse estudo, cada botão apresentava cerca de 4 a 5 sementes em média.

Durante processo indução teve-se a regeneração de planta, passagem de estágio de embrião e calos para plântula (Fig. 2D) ainda no processo de regeneração entre as trocas de meio BDS para o meio MS observou-se formação de bulbo em meio de cultura (Fig. 2F) e em seguida tem-se a aclimação das plântulas que conseguiram ser regeneradas (Fig. 2G). San Noem (1979) ao analisar a origem dos proembriões ginogênicos em ovários de cevada os seus melhores resultados foram obtidos a partir dos proembriões originários da célula-ovo ou das células antípodas; as das sinérgides deram origem à proliferação de estruturas semelhantes a calos, resultados que também foram observados na indução de embriões ginogênicos em cebola. O que nos leva a afirmar que os embriões podem ser induzidos a partir de várias partes

do óvulo, incluindo tegumentos, ovo e antípodas, embora antípodas não persistam em muitas espécies de *Allium* (KELLER 1990; KELLER & KORZUN 1996). Em cebola, as observações do desenvolvimento embrionário ginógeno têm sido limitadas (KELLER & KORZUN 1996). Em tomate observações microscópicas da embriogênese ginogênica revelaram a formação de aglomerados de células nos estágios iniciais de desenvolvimento que cessaram o crescimento às custas dos tegumentos (ZHAO et al., 2014). Já para essas variedades de *Allium* em estudo observa-se que não se teve a parada do crescimento, elas chegaram a formação de plântulas e que o tegumento não interferiu no desenvolvimento do embrião.



**Figuras 2.** Estádios de desenvolvimento de embriões ginogênicos das cultivares de cebola IPA 11 e BRS sob efeito de doses de reguladores de crescimento (A). Botão floral com crescimento e desenvolvimento de embrião BRS Alfa São Francisco. (B) Formação de calos na base do botão floral variedade IPA 11. (C) formação de embriões variedade IPA 11. (D) Formação de embrião variedade BRS Alfa São Francisco. (E) Bulbo formado *in vitro* variedade IPA 11. (F) processo de regeneração de plantas meio MS. (G) plântulas em processo de aclimação. Fonte: (RODRIGUES, C.A.P.S).

Do total de 9.600 botões florais inoculados (Tabela 1) 1.427 (46,8%) formaram calos, 203 (4,2%) formaram plantas e 3 (0,06%) formaram plantas albinas, suas radículas não se distinguiram do pseudo caule, após 10 dias elas adquiriram uma tonalidade esverdeada quando transferidas para o meio de regeneração e expostos a luz, onde acabaram morrendo

sem formar plantas (Fig. 3) e 48,94% dos botões inoculados foram perdidos por contaminação e morte do explantes. A inoculação de um número grande de botões florais é necessário no cultivo *in vitro* para indução de plantas haploides pois a taxa de indução de embriões ginogênicos é baixa, então para compensar as perdas por contaminação, formação de calos basais e morte dos botões florais o mais indicado é aumentar o número de botões inoculados tendo-se maiores chances de se ter um haploide ou duplohaploide (Khan et al., 2020).

Plantas albinas é um fator limitante na transformação gênica, que demonstra a baixa eficiência das técnicas de cultura de tecidos vegetais *in vitro* para algumas espécies de plantas. Aliada a isso, em muitas situações a esterilidade total ou parcial delas pode consistir em barreira para a finalização deste processo (Almeida & Borem, 2017).

**Tabela 1.** Formação de calos, embriões e plantas albinas *in vitro* em cebola (*Allium cepa* L.) IPA11 e BRS Alfa São Francisco.

	Total					
	NBTV	NCF%CFV	NEM	%EFPV	NPAB	% PABV
<b>TOTAL</b>	9600	142746,8	203	4,2	3	0,06

Número de botões viáveis (NBTV), número de calos formados por variedade (NCF), porcentagem de calos Formados por variedade (%CFV), número de embriões formados (NEM), porcentagem de embriões formados por variedade (%EFPV), número de plantas albinas (NPAB), e porcentagem de plantas albinas (%PABV).



**Figura 3.** Formação de Embriões albino variedade BRS (A), planta albina variedade IPA-11 (B) (RODRIGUES, C.A.P.S)

De acordo com o resumo da análise de variância para a variedade IPA11, apresentou interações significativas entre as doses de 2,4-D e de BAP para as variáveis número de calos formados, comprimento da folha principal e comprimento da raiz principal, com efeito significativo a nível de 5% de probabilidade, assim como também houve significância nos níveis de 1 e 5% de probabilidade, quando as doses foram analisadas isoladamente para as

variáveis indução de bulbo, número de calo, diâmetro do calo, número de folhas, comprimento de folhas e comprimento da raiz principal para as doses de 2,4D (Tabela 2).

Para as doses isoladas de BAP, observaram-se significância para quase todas as variáveis, em níveis de 1 e 5% de probabilidade, exceto para as variáveis indução de bulbo formado e número de plântulas albinas que não foi observada significância. Pode-se inferir que a concentração e a combinação dos reguladores de crescimento testados juntamente com sua interação com os níveis endógenos de hormônios presentes no explante são determinantes. Conforme Pérez-Toreno et al., (2000), os efeitos decorridos do balanço entre os diferentes hormônios de crescimento sobre o desenvolvimento *in vitro* dependem do genótipo testado, tornando necessário o estudo individualizado para cada espécie ou cultivar pois cada uma apresenta uma necessidade diferente.

**Tabela 2.** Resumo da análise de variância da influência de diferentes concentrações de 2,4-D e BAP na regeneração *in vitro* de embriões ginogênicos de *A. cepa* L, variedade IPA 11.

FV	GL	QM							
		IBF	NEM	NCF	DC	NF	CFP	CRP	NPAB
Doses de 2,4-D	2	9,53**	0,11 <sup>ns</sup>	74,58 *	1,01 **	70,33**	126,24**	85,70**	0,048 <sup>ns</sup>
Doses de BAP	2	1,63 <sup>ns</sup>	1,06 *	86,1*	1,75 **	8,14*	35,87**	34,35**	0,071 <sup>ns</sup>
2,4-Dx BAP	4	0,99 <sup>ns</sup>	0,30 <sup>ns</sup>	84,30**	0,19 <sup>ns</sup>	4,26 <sup>ns</sup>	14,49**	10,49**	0,047 <sup>ns</sup>
Resíduo	54	1,28	0,21	18,33	0,09	2,06	3,14	1,77	0,046
Total	62	95,74	15,26	1648,88	11,52	285,71	552,03	377,90	2,85
CV%		121,07	154,43	74,11	28,10	67,121	62,34	56,28	458,25

Indução de bulbo formado (IBF), número de embriões formados (NEM), número de calos formados (NCF), diâmetro do calo (DC), número de folhas (NF), comprimento de folha principal (CFP), comprimento raiz principal (CRP) e número de planta albina (NPAB). ns, \*, \*\*: não significativo, significativo a 5% e 1%, respectivamente, pelo teste F.

O teste de comparação de médias de Scott-Knott, revelou diferenças significativas, a nível 5% de probabilidade, podendo observar que para as variáveis número de embriões e número de folhas tem-se a formação de dois grupos, já para a variável número de embriões tem-se a formação de três grupos distintos, a variedade IPA11 apresenta os maiores e melhores valores quando o meio de cultivo não é suplementado com regulador de crescimento BAP.

Ainda analisando a variedade IPA 11 sendo agora em doses de 2,4D, observa-se formação de dois grupos para as variáveis indução de bulbo e diâmetro do calo, para a variável número de folha tem-se a formação de três grupos diferente. A variedade IPA11 tem os melhores e maiores valores quando o meio não tem suplementação de reguladores de crescimento, BAP e 2,4D, pois na dose 0 mg.L<sup>-1</sup> é onde ela apresentou maior efeito significativo (Tabela 3).

O uso de doses adequadas de auxinas (2,4-D) e citocininas (BAP) de forma exógena pode interferir no balanço interno das auxinas e citocininas endógenas e desencadear uma

resposta de indução de novos meristemas em explantes cultivados *in vitro*, a presença constante ou excessiva de citocininas e de auxinas no meio de indução pode desequilibrar exageradamente o balanço hormonal endógeno dos explantes além de inibir as respostas desejadas (LEMOS, 2014).

A presença de citocinas no meio de cultura tem sido reportada como indutor de maior resposta morfo genética *in vitro* (BORGES et al., 2005). Em baixas concentrações, as auxinas auxiliam no crescimento normal de embriões e da raiz, enquanto que em concentrações mais elevadas, pode apresentar efeito inibitório ou favorecer na formação de calos (TAIZ E ZEIGER, 2017).

Explantes cultivados em meio contendo 2,4D, apresentaram um aumento significativo na indução de bulbo, diâmetro de calo e número de folhas sendo verificado um efeito positivo ao se utilizar o hormônio 2,4D, evidenciando a importância da utilização do regulador de crescimento para indução da divisão celular e conseqüentemente para formação de bulbos na espécie em estudo. Resultados próximos aos encontrados neste trabalho foram obtidos por Silva et al. (2016), onde os autores testaram efeito da 2,4D e de BAP sobre o estabelecimento *in vitro* de segmentos nodais de Rosa sp. no qual, verificaram que as maiores taxas de explantes responsivos foram obtidas nas maiores concentrações do hormônio BAP. Enquanto que os números de brotações, foram mais responsivas com o uso de 2,4D no meio de cultivo, o desenvolvimento de novos bulbos requer muita energia e por conseqüência inibe o desenvolvimento de outras variáveis importantes para a planta (GOELZER et al., 2019).

**Tabela 3.** Teste de média na indução de embriões ginogênicos *in vitro* de *A. cepa* L. Variedade IPA-11, sobre diferentes doses de BAP e 2,4-D pelo teste de Scott-Knott a nível de 5% de probabilidade.

BAP (mg.L <sup>-1</sup> )	IB	NEM	DC	NF
0	1,14a	0,47 <sup>a</sup>	1,38a	2,57 <sup>a</sup>
1	1,04a	0,38 <sup>a</sup>	1,12b	2,42 <sup>a</sup>
2	0,61a	0,04b	0,08c	1,42b
2,4-D (mg.L <sup>-1</sup> )				
0	1,71a	0,38 <sup>a</sup>	1,30a	3,61 <sup>a</sup>
1	0,57b	0,28 <sup>a</sup>	1,14a	2,71b
2	0,52b	0,23 <sup>a</sup>	0,86b	0,95c

Indução de bulbo (IB), número de embriões (NEM), diâmetro do calo (DC), número de folhas (NF), número de plantas albinas (NPAB). Médias seguidas com mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Para a variedade IPA 11, não foi observado diferença significativa no número de calos nos tratamentos com 0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP combinados às diferentes doses de 2,4D (0,1 e 2 mg.L<sup>-1</sup>

<sup>1)</sup> (Tabela 4). Já nos tratamentos com meio de cultura suplementado com adose 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP combinado com diferentes concentrações de 2,4D (0, 1 e 2 mg.L<sup>-1</sup>), os tratamentos 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 1 e 2 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4D apresentaram maior número de calos. Portanto quando a intenção é induzir a formação de calos doses combinadas de auxinas e citocininas podem trazer resultados esperados porque nas combinações é possível obter os melhores valores para ambas necessidade de indução direta ou indireta.

Os efeitos positivos induzidos pela combinação dos reguladores na formação de calos em botões de cebola, nesse estudo deve-se ao fato que a auxina é o regulador indutor da calogênese mais eficiente. Esse regulador tem o papel de produzir o aumento dos níveis endógenos de auxinas e estimular o início da desdiferenciação seguido da divisão e multiplicação celular (CARNEIRO et al., 2014).

Tratamento com 1mg.L<sup>-1</sup> de BAP apresentou o menor número de calos quando combinada com a dose 0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4D. Para a dose de 2 mg.L<sup>-1</sup> de BAP não foi observado efeito significativo para as doses testadas de 2,4D.

Esse comportamento deve-se pelo fato das auxina serem as mais recomendadas para a indução de calos, porém não existe um padrão de qual concentração é mais eficiente, uma vez que o genótipo pode influenciar diretamente o processo *in vitro*. Alguns fatores como o tipo de explante utilizado, e as condições de cultivo também influenciam no efeito dos reguladores vegetal e no sucesso do cultivo *in vitro* (INÁCIO,2010; LEMOS et al., 2010).

Para a característica comprimento da folha principal, observou-se diferença nos tratamentos com 0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP combinados às diferentes doses de 2,4D (0 e 1 mg.L<sup>-1</sup>) nessas concentrações foram obtidos os maiores comprimentos da folha. Portanto podemos inferir que as combinações de explante, meio de cultivo e reguladores de crescimento são importantes pois influenciam no crescimento de folhas *in vitro*, pois mesmo que no meio não tenha a presença de citocininas ainda assim a variedade consegue apresentar influência no comprimento da folha principal, tornando os reguladores de crescimento um componente importante na indução *in vitro*.

Os hormônios e reguladores vegetais são substâncias essenciais para os processos fisiológicos que promovem a formação de novos tecidos e conseqüentemente, folhas, flores, frutos e sementes (CASTRO & VIEIRA, 2012; PETRI et al., 2016). Já nos tratamentos com meio de cultura suplementado com a dose 1 mg.L<sup>-1</sup> de BAP combinado com a dose de 2mg.L<sup>-1</sup> de 2,4D apresentou o menor valor para ao comprimento de folhas. As demais doses de 2,4D quando combinadas com 1mg.L<sup>-1</sup> de BAP não apresentaram diferença significativa para essa variável. Com relação a dose de 2mg.L<sup>-1</sup> de BAP, observa-se efeito significativo no

comprimento da folha principal nos tratamentos de  $2\text{mg.L}^{-1}$  de BAP combinada com a dose de  $0\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4D onde foi encontrado o maior valor médio para essa variável.

Os reguladores de crescimento são substâncias que desencadeiam as respostas fisiológicas nas plantas, como o desenvolvimento ou a inibição da formação de tecidos e órgãos vegetais, podendo atuar sozinhas ou em conjunto com outros grupos de substâncias, compondo o balanço hormonal (SILVA et al., 2013; FAGAN et al., 2015). RAVEN et al. (2012) citam que as principais funções da auxina é a regulação e promoção de crescimento por alongamento de caules e folhas novas, atuando na divisão e no alongamento celular, formando novos tecidos nas plantas.

Para a variável comprimento da maior raiz, na dose  $0\text{mg.L}^{-1}$  de BAP observou-se diferença significativa apenas na dose de  $2\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4D essa combinação apresentou menor valor para essa variável. Os reguladores de crescimento são substâncias sinalizadoras, responsáveis por efeitos marcantes no desenvolvimento das plantas, atuando em concentrações e combinações bastante pequenas (ECCO et al., 2019).

Portanto, essas doses foram eficientes para a indução e formação de raízes em brotos de cebola, as auxinas contribuem em muitos outros processos fisiológicos nas plantas, como; induz a formação de raízes em estacas, promove a cicatrização de lesões nos tecidos, induz o alongamento e crescimento celular e tecidual; induz a divisão celular em tecidos na formação de calos (tecidos diferenciados que podem resultar na formação de raízes) principalmente na presença de outro regulador de crescimento (FAGAN et al., 2015).

Nos tratamentos utilizando  $0\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4D houve diferença significativa apenas para a combinação na dose de  $2\text{mg.L}^{-1}$  de BAP, essa combinação promoveu o maior valor para a variável número de calos formados, nos tratamentos utilizando  $1\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4D, observa-se diferença significativa apenas na combinação com  $0\text{mg.L}^{-1}$  de BAP, essa combinação que apresentou menor formação de calos. Já para a dose  $2\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4D, houve diferença significativa apenas na combinação com  $1\text{mg.L}^{-1}$  de BAP, essa combinação proporcionou maior valor para a variável analisada.

Com relação ao comprimento da folha na dose de  $0\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4D a combinação com as doses  $1$  e  $2\text{mg.L}^{-1}$  de BAP promovem redução no comprimento dessa variável, para a dose de  $1\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4D observa-se que a combinação  $1\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4D combinada com  $2\text{mg.L}^{-1}$  de BAP foi a que diferiu das demais doses reduzindo drasticamente o tamanho da folha para a dose de  $2\text{mg.L}^{-1}$  de 2,4D não observou-se diferença significativa entre as combinações testadas.

Para a variável comprimento da maior raiz na dose 0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4D combinada com 1mg.L<sup>-1</sup> de BAP resultou no menor valor da variável analisada, diferindo estatisticamente das demais combinações na dose 0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4D. As citocininas; promove a formação de raízes laterais em superfícies cortadas de caules; Induz o crescimento de frutos partenocárpico, induz a brotação de folhas próximo das gemas, induz na produção de etileno, por exemplo.

Em relação a dose de 1mg.L<sup>-1</sup> de 2,4D observou-se o mesmo comportamento da dose de 0 mg.L<sup>-1</sup> desse hormônio. Já para a dose 2 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4D não houve diferença significativa das combinações testadas. Essa interação entre os diferentes reguladores, concentrações e a totipotencialidade das células utilizadas afetam as rotas morfogênicas em tecidos vegetais *in vitro*. Assim, o emprego das auxinas no cultivo *in vitro* pode atuar tanto na indução de calos, comprimento de folhas, quanto na formação de raízes (GUEYE et al., 2009; LAVANYA et al., 2014).

No presente estudo, considerou-se que os níveis das auxinas e citocininas proporcionaram o desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea, necessários à propagação da espécie. Resultados semelhantes ao deste trabalho têm sido relatados com sucesso para outras espécies bulbosas, como *Narcissus* (SEABROOK, 1990), e para raízes de mandioca (SATO et al., 2001) submetidas ao meio de cultura suplementados com auxinas e citocininas.

**Tabela 4.** Desdobramento da interação (2,4-D x BAP) para as variáveis número de calo (NC), comprimento da folha principal (CFP) e comprimento da raiz principal (CRP), no cultivo *in vitro* de embriões ginogênicos de cebola (*Allium cepa* L) na variedade IPA11.

BAP (mg.L <sup>-1</sup> )	NCF			CFP			CMP		
	2,4-D (mg.L <sup>-1</sup> )								
	0.0	1.0	2.0	0	1.0	2.0	0	1.0	2.0
0.0	3,14bA	2,85bA	4,42bA	5,73aA	6,19aA	0,04aB	4,51aA	5.19aA	0,11aB
1.0	0,85bB	8,14aA	10,71aA	4,10bA	5,25aA	0,01aB	2,14bA	0,56bB	0,01aB
2.0	6,85aA	10,28aA	4,71bA	3,28bA	0,98bB	0,01aB	4,30aA	4,45aA	0,01aB

Número de calo (NC), comprimento de folhas (CF) e comprimento da raiz principal (CRP). Médias seguidas da mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Para a variedade BRS Alfa São Francisco (Tabela 5), observou-se que a interação (2,4D x BAP) foi significativa para as características indução de bulbo e diâmetro do calo com níveis de significância de 5 % de probabilidade observando a importância que tanto as auxinas quanto das citocininas para o desenvolvimento dos vegetais, sendo portanto o correto balanço dos reguladores de crescimento de extrema importância para os vegetais e quando este ajuste é feito dentro das técnicas contidas na cultura de tecidos é possível observar

diferenças na quantidade e na taxa dos padrões de crescimento dos explantes (CORPES et al., 2021).

Analisando isoladamente a variável número de calo formado observa-se que foi significativa apenas para as doses de 2,4-D a nível 1% de probabilidade. Quando o meio de cultivo é suplementado com reguladores de crescimento vegetal eles tem a função de suprir prováveis deficiências de fitormônios nos explantes oriundos da planta matriz com o objetivo de induzir os processos de desdiferenciação e rediferenciação celular, culminando na formação de tecidos e órgãos determinantes para o desenvolvimento da planta *in vitro* (PIZA et al., 2001). Os autores Almeida e Rodrigues (2016) relatam que os fitormônios e/ou reguladores de crescimento podem interferir no desenvolvimento vegetal o qual pode influenciar diversas respostas na planta como dominância apical emissão de raízes entre outras, além de respostas ao nível celular como a divisão e a diferenciação celular formando calos. Em relação às citocininas, estas podem atuar a nível celular induzindo a expressão de determinados genes, promovendo a formação de brotos, além de influenciar na dominância apical e na inibição do crescimento das raízes (YEW et al., 2010; ALMEIDA et al., 2020).

**Tabela 5.** Resumo da análise de variância (quadrados médios) da influência de diferentes concentrações de 2,4-D e BAP na regeneração *in vitro* de embriões ginogênicos de *A. cepa* L., variedade BRS Alfa São Francisco .

FV	GL	QM							
		IBF	NEM	NCF	DC	NF	CFP	CRP	NPAB
BAP	2	0,97ns	0,30ns	97,16**	3,575**	0,16ns	0,25 <sup>ns</sup>	0,48 <sup>ns</sup>	0,04 <sup>ns</sup>
2,4d	2	0,96ns	0,78ns	9,35ns	1,19**	0,15ns	0,26 <sup>ns</sup>	0,71 <sup>ns</sup>	0,07 <sup>ns</sup>
2,4-D x BAP	4	1,06*	0,35ns	16,08ns	0,67**	0,015ns	0,25 <sup>ns</sup>	0,34 <sup>ns</sup>	0,07 <sup>ns</sup>
Resíduo	54	0,37	0,50	9,96	0,17	0,016	0,24	0,36	0,06
Total	62	0,45	0,49	13,15	0,34	0,015	0,20	39,01	2,35
Cv%		227,14	44,43	128,33	39,15	793,73	793,73	261,15	94,39

Indução de bulbo formado (IBF), Número de embriões formados (NEM), Número de calos (NC), diâmetro do calo (DC), Número de folhas (NF), Comprimento da folha principal (CFP), Comprimento raiz principal (CRP) e Número de planta albina (NPAB). ns, \*, \*\*: Não significativo e significativo a 5% e 1%, respectivamente, pelo teste F.

Para a variedade BRS Alfa São Francisco (Tabela 6) nas doses isoladas dos reguladores de crescimento a variável número de calo formou dois grupos, onde a dose que apresentou maior formação de calo foi na dose de 1mg.L<sup>-1</sup>. As demais variáveis tiveram a formação de apenas um grupo, não apresentando diferença significativa. Ferreira et al. (2020)

trabalhando com a indução de brotos *in vitro* em maracujazeiro doce com doses de BAP de (0 mg L<sup>-1</sup>), (0,5 mg L<sup>-1</sup>) e (1,5 mg L<sup>-1</sup>) observou que tanto na ausência (0 mg L<sup>-1</sup>) quanto a menor (0,5 mg L<sup>-1</sup>) e maior (1,5 mg L<sup>-1</sup>) concentração de BAP tenderam a produzir menos brotações e, por consequência, menor crescimento da parte aérea. Provavelmente, o maior número de embriões, diâmetro do calo e número de folhas apresentado com a concentração de 0 a 2 mg L<sup>-1</sup> BAP pode estar relacionada a alta atividade da citocinina nos explantes utilizados para indução (BAKHTIAR; MIRJALILI; SONBOLI, 2016) e ao equilíbrio entre a concentração endógena (explante) e exógena aplicada, estimulando a sinergia entre as diferentes origens da citocinina.

Sendo o BAP considerado o fitorregulador sintético de uso mais abrangente, utilizado nas etapas de propagação *in vitro*, com influência mais efetiva para multiplicação de diversas espécies de plantas e com o menor custo de aquisição (ARAGÃO et al., 2011; DZIEDZIC, 2016). Já para os efeitos isolados do regulador 2,4-D na variedade BRS Alfa São Francisco, não foi observado diferença significativa para nenhuma das variáveis analisadas. Este trabalho difere dos resultados encontrados por Almeida et al. (2020) que

testou doses de 0,75 e 1 mgL<sup>-1</sup> 2,4-D obtendo 100% de formação de calo, os quais não diferiram entre si, quando comparou com os tratamentos sem reguladores.

A indução de respostas de um explante requer do mesmo fornecimento adequado de nutrientes no ambiente, reguladores de crescimento e condições ambientais adequada para que se tenham sucesso no cultivo *in vitro* (Soorni & Kahriz, 2015). Phua et al. (2016) obteve calo da planta medicinal *Clinacanthus nutans* com maior média de calos frescos massa usando explantes de folhas jovens em meio de cultura suplementado com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D. Almeida et al., (2020) ao utilizar segmentos nodais no cultivo *in vitro* de jambu em meio de cultura suplementado com 0,125 mg.L<sup>-1</sup> BAP apresentou maior número de calos sendo possível o uso apenas de BAP para a formação de calos, os autores também observaram que apenas com BAP em concentrações mais elevadas foi obtido a formação de folhas com desenvolvimento anormal.

**Tabela 6.** Teste de média na indução de embriões ginogênicos *in vitro* de (*Allium cepa* L.) variedade BRS Alfa São Francisco, sobre diferentes doses de BAP e 2,4-D pelo teste de Scott-knott a nível de 5% de probabilidade.

<b>BAP</b> mg L <sup>-1</sup>	NEM	NCF	NF	CFP	CRP	NPAB
0.0	0,14a	4,90a	0,04a	0,19a	4,51 <sup>a</sup>	0,07 <sup>a</sup>
1.0	0,28a	1,161b	0,01a	0,01a	5,19 <sup>a</sup>	0,07 <sup>a</sup>
2.0	0,34a	0,85b	0,01a	0,01a	4,30 <sup>a</sup>	0,07 <sup>a</sup>
<b>2,4d</b> mg L <sup>-1</sup>						
0.0	0,04a	3,0 a	0,01a	0,01a	4,0a	0,07 <sup>a</sup>
1.0	0,04a	1,71a	0,01a	0,01a	3,42 <sup>a</sup>	0,07 <sup>a</sup>
2.0	0,36a	2,66a	0,04a	0,01a	3,28 <sup>a</sup>	0,07 <sup>a</sup>

Número de embriões (NEM), Número de calo formado (NCF), Número de folhas (NF), Comprimento da folha principal (CFP), Comprimento da raiz principal (CRP), Número de plantas albinas (NPAB). Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de ScottKnott a 5% de probabilidade

Observou-se diferença significativa entre as doses de reguladores administrada e a variedade BRS Alfa São Francisco, para duas características, indução de bulbo e diâmetro do calo. As auxinas e citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas no cultivo *in vitro* (CALDAS et al., 1998), ao desdobrar a interação (doses de 2,4-D x doses BAP) para a variedade BRS Alfa São Francisco, observou-se que para a indução de bulbo (IB) os maiores valores médios foram obtidos nas doses em que o meio foi suplementado apenas com 2,0 mgL<sup>-1</sup> de 2,4-D e também nas combinações de 1,0 mgL<sup>-1</sup> de BAP + 1mgL<sup>-1</sup> de 2,4-D. Provavelmente o nível endógeno de citocinina nos botões florais de cebola, foi suficiente para induzir a formação de bulbo, tendo o BAP efeito inibitório quando adicionado ao meio de cultura, Segundo Cordeiro et al. (2005), elevadas concentrações de citocinina parecem reagir com a quantidade de auxina endógena do explante, o que leva à formação de calos

provocando certa inibição no surgimento de brotos.

Para a variável diâmetro do calo observou diferença significativa entre as doses de fitohormônio administrada (Tabela 7) na variedade BRS Alfa São Francisco combinação de 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP + 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D, foi a combinação entre os fitohormônio onde a variável diâmetro do calo apresentou maiores valores médios. Na presença de BAP não houve diferença significativa nas médias da variável DC em função das doses de 2,4-D utilizadas. De acordo com Rosa et al. (2015) a alta formação de calos pode também ser obtida em meio de cultura com somente um tipo de regulador de crescimento, como a auxina.

**Tabela 7.** Desdobramento da interação (2,4-D x BAP) no cultivo *in vitro* de embriões ginogênicos de cebola (*Allium cepa* L.) na variedade BRS Alfa São Francisco

BAP (mg.L <sup>-1</sup> )	IB			DC		
	0,0	1,0	2,0	0,0	1,0	2,0
0,0	0,01aB	0,01bB	0,85aA	0,31bB	1,18bA	0,32bB
1,0	0,01aB	0,85aA	0,57aA	1,37aA	1,05bA	1,01aA
2,0	0,01aA	0,00bA	0,01bA	1,28aA	1,72aA	1,24aA

(IB): Indução de Bulbo, (DC): diâmetro do calo. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Quanto a porcentagem de calos e embriões ginogênicos de *Allium cepa*, induzidos *in vitro* a partir de diferentes concentrações os tratamentos que apresentam maior resposta é o tratamento nove para a variedade IPA 11( 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP) nesse tratamento tem-se maior formação de embriões. Já para a variedade BRS Alfa São Francisco o melhor tratamento é o tratamento dois (1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP) o qual apresenta maior formação de embriões para essa variedade (Tabela 8).

Em estudo envolvendo embriogênese saber de doses corretas de reguladores de crescimento de plantas *in vitro* diminui o tempo de testes, pois tratamentos que apresentam maior crescimento de calos não são desejado na indução de embriões ginogênicos, pois esses calos podem vir de tecidos diploides a escolha de tratamentos e cultivares que induzam menor formação de calo é muito pertinente nesses casos de induções que se deseja plantas haploides.

O sucesso na obtenção de embriões ginogênicos deve-se levar em consideração alguns pontos, como genótipo da planta doadora, condição nutricional da planta, composição do meio, explantes que serão utilizados não esquecendo dos reguladores de crescimento de plantas adicionados ao meio de cultura, os quais têm efeito significativo sobre a ginogênese (MUKHAMBETZHANOV, 1997; BOHANEK, 2009; MUROVEC & BOHANEK, 2012).

Os tratamentos que apresentaram menor rendimento de embriões podem ser explicado devido aos genes deletérios que regulam o crescimento vegetativo e dificultam o

desenvolvimento do embrião ginogênico e a regeneração da planta (HYDE et al., 2012). Os resultados obtidos nesse estudo são considerados satisfatórios, pois a técnica aplicada é uma avaliação sobre o desempenho dos processos de ginogênese e que estes valores geralmente são muito baixos ou chegam a não ter nenhum resultado.

Yarali e Yanmaz (2017), trabalhando com a cultivar de cebola Yakut, conseguiu formação de 36,28% calo, diferente desse estudo apresentado, mas deve-se levar em consideração a variedade de cebola que esses autores utilizaram, assim como a metodologia tendo em vista que o uso de botões florais subcultivados com a extração do ovário tem menor formação de calos, os calos podem ser originado de tecidos somáticos do botão floral.

As variedades IPA 11 e BRS Alfa São Francisco estão numa faixa superior aos relatos de rendimento indução de embriões ginogênicos, quando comparados aos trabalhos de Muren (1989) e Campion et al., (1995), ambos tiveram retornos variando de 0,1% a 5%. Já Bohanec et al. (1995) utilizando óvulos obteve 0,15% de regeneração, destes foram aclimatadas com sucesso 0,02% de plantas. Portanto sendo conhecedor de todas essas evidências, pode-se afirmar que as duas cultivares de cebola empregadas neste estudo respondem satisfatoriamente à indução de embriões ginogênicos e podem ser usadas para fins de indução de embriões haploides.

**Tabela 8.** Porcentagem de calos e embriões ginogênicos de *Allium cepa* L. induzidos *in vitro* a partir de diferentes concentrações de 2,4-D e BAP nas variedades IPA 11 e BRS Alfa São Francisco.

VARIEDADE – IPA 11		
Tratamentos	% de calos	% Embriões
0 mg.L <sup>-1</sup> 2,4-D + 0 mg.L <sup>-1</sup> de BAP	7,14	7,8
1,0 mg.L <sup>-1</sup> de BAP	6,42	0,7
2,0 mg.L <sup>-1</sup> de BAP	12,14	7,8
1,0 mg.L <sup>-1</sup> de 2,4-D	27,14	5
1,0 mg.L <sup>-1</sup> de 2,4-D + 1,0 mg.L <sup>-1</sup> de BAP	37,14	5,7
1,0 mg.L <sup>-1</sup> de 2,4-D + 2,0 mg.L <sup>-1</sup> de BAP	11,42	6,4
2,0 mg.L <sup>-1</sup> de 2,4-D	25,71	0,7
2,0 mg.L <sup>-1</sup> de 2,4-D + 1,0 mg.L <sup>-1</sup> de BAP	8,57	2,8
2,0 mg.L <sup>-1</sup> de 2,4-D + 2,0 mg.L <sup>-1</sup> de BAP	12,8	12,8
VARIEDADE – BRS Alfa São Francisco		
Tratamentos	% de calos	% Embriões
0 mg.L <sup>-1</sup> 2,4-D + 0 mg.L <sup>-1</sup> de BAP	7,8	0
1,0 mg.L <sup>-1</sup> de BAP	12,14	11,42
2,0 mg.L <sup>-1</sup> de BAP	19,28	3,5
1,0 mg.L <sup>-1</sup> de 2,4-D	5,7	0,7
1,0 mg.L <sup>-1</sup> de 2,4-D + 1,0 mg.L <sup>-1</sup> de BAP	15,71	0,7
1,0 mg.L <sup>-1</sup> de 2,4-D + 2,0 mg.L <sup>-1</sup> de BAP	38,57	0,2
2,0 mg.L <sup>-1</sup> de 2,4-D	39,28	0,7
2,0 mg.L <sup>-1</sup> de 2,4-D + 1,0 mg.L <sup>-1</sup> de BAP	34,28	0
2,0 mg.L <sup>-1</sup> de 2,4-D + 2,0 mg.L <sup>-1</sup> de BAP	16,42	0

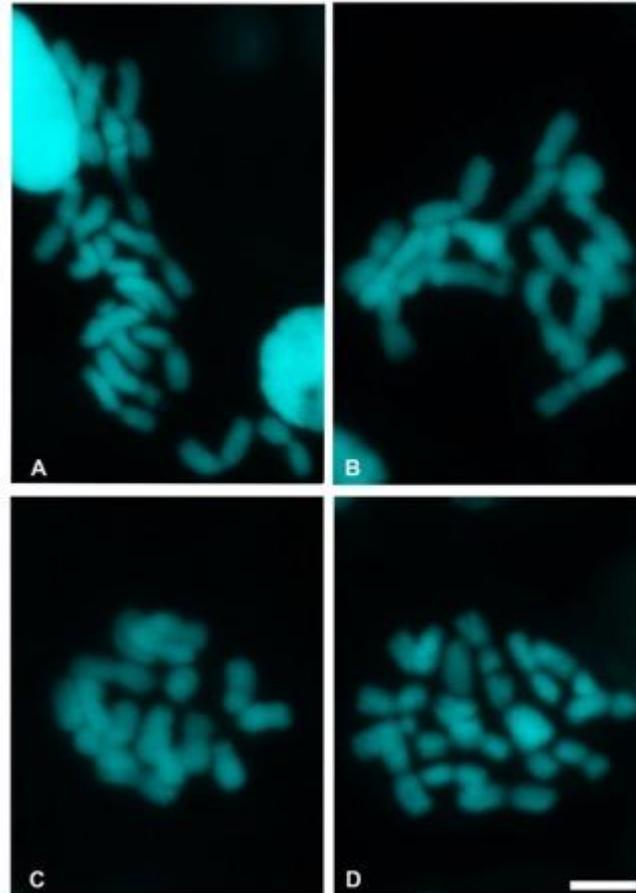
Para a análise de citogenética evidenciou a quantidade de cromossomos de todas plântulas que sobreviveram a aclimação. Observou que número cromossômico de todas as plântulas analisadas foi de  $2n = 16$  (Fig 3) possivelmente tenha ocorrido a duplicação de forma espontânea das plantas, essa é uma das características de indução de haploide em cultivares de cebola.

A duplicação de forma espontânea é um fator de importância nesses estudos que envolvem haploides, uma vez duplicada de forma natural sem o uso de antimetabólito uma vez que eles são um dos responsáveis por grandes perdas de embriões e plântulas devidoos testes de doses que vão das doses mais excessivas que acabam sendo letais até a que causa menos danos aos explantes utilizados.

Em estudos com objetivo de obter embriões ginogênicos os autores Geoffriau et al. (1997) obtiveram dentre os regenerantes 82,13% de duplo haploides espontâneos, afirmando assim o potencial para duplicação espontânea que a cebola apresenta. Alan et al. (2004) observaram que 15% dos regenerantes eram duplo-haploides espontâneos). Allan et al.(2016) nos seus primeiros estudos usando esta estratégia para duplicação de cromossomos, obteve um resultado de 60% das plantas somáticas regeneradas de flores

haploides as quais foram duplicadas espontaneamente.

Fayos et al. (2015) obtiveram uma porcentagem média de plantas duplo haploides entre os regenerantes de 55,8% esses trabalhos corroboram com os resultados obtidos nesse estudo onde teve-se plântulas e embriões duplo haploide regenerados de forma espontânea, portanto as variedades IPA 11 e BRS Alfa São Francisco são eficientes tanto na indução de embriões haploides quanto na regeneração e duplicação de plântulas duplohaploide.



**Figura 3** Análise de citogenética da ponta de raiz de cebola *Allium Cepa* L regeneradas *in vitro* via ginogênese. Todas as plantas apresentaram nível de ploidia  $2n = 16$ .

#### 4 CONCLUSÃO

A obtenção de embriões haploides utilizando a técnica de ginogênese para as duas variedades estudadas IPA11 e BRS Alfa São Francisco, respndem de forma diferente e eficientes aos tratamentos, sendo que a variedede IPA 11 tmais responsiva em meios que continha  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 2,4-D +  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP, formando maior numero de embriões e menor número de calo. A variedade BRS Alfa São Francisco é mais responsiva em tratamentos que continham  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP, tendo maior número de embriões e menor numero de calo. Portanto as cultivares IPA 11 e BRS Alfa São francisco apresentam

capacidade ginogênica e essa capacidade melhora quando o meio de cultura é suplementado com doses de BAP e 2,4D. As duas variedades também apresentam a capacidade de duplicação de forma espontânea sem que haja necessidade de uso de antimitótico

## REFERÊNCIAS

- ALAN, Ali R. et al. Fecund gynogenic lines from onion (*Allium cepa* L.) breeding materials. **Plant science**, v. 167, n. 5, p. 1055-1066, 2004.
- ALAN, Ali 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, Ali R. et al. Complementary strategies for ploidy manipulations in gynogenic onion (*Allium cepa* L.). **Plant Science**, v. 173, n. 1, p. 25-31, 2007.
- ALAN, Ali 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.
- DE ALMEIDA, Emizael Menezes et al. O uso de reguladores de crescimento vegetal em plantas forrageiras. 2015.
- ALMEIDA, G. M.; RODRIGUES, J. G. L. Desenvolvimento de plantas através da interferência de auxinas, citocininas, etileno e giberelinas. **Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science**, v. 9, n. 3, p. 111-117, 2016.
- JÚNIOR, Américo Wagner; BRUCKNER, Claudio Horst. MUTAÇÕES EM ESPÉCIES FRUTÍFERAS. **Sistemas de Produção Agropecuária—Ano 2009**, 2009.
- ANANDHAN, Sivalingam et al. Variation in gynogenic potential for haploid induction in Indian short-day onions. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, v. 74, n.4, p. 526-528, 2014.
- ARAGÃO, Ana Katarina Oliveira; ALOUFA, Magdi Ahmed Ibrahim; COSTA, Igordo Amaral. O efeito do BAP (6-benzilaminopurina) sobre a indução de brotos em explantes de pau-brasil. **Cerne**, v. 17, p. 339-345, 2011.
- BAKHTIAR, Ziba; MIRJALILI, Mohammad Hossein; SONBOLI, Ali. In vitro callus induction and micropropagation of *Thymus persicus* (Lamiaceae), an endangered medicinal plant. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 16, p. 48-54, 2016.
- BAKHTIAR, Ziba; MIRJALILI, Mohammad Hossein; SONBOLI, Ali. In vitro callus induction and micropropagation of *Thymus persicus* (Lamiaceae), an endangered medicinal plant. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 16, p. 48-54, 2016.

- BARROS E SILVA, A. E.; GUERRA, M. The meaning of DAPI bands observed after C-banding and FISH procedures. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 85, n. 2, p. 115-125, 2010.
- 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, Borut. Doubled haploids via gynogenesis. In: **Advances in haploid production in higher plants**. Springer, Dordrecht, 2009. p. 35-46.
- BOHANEK, Borut; JAKŠE, Marijana. Variations in gynogenic response among long-day onion (*Allium cepa* L.) accessions. **Plant Cell Reports**, v. 18, n. 9, p. 737-742, 1999.
- BOHANEK, Borut et al. Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.): induction procedures and genetic analysis of regenerants. **Plant Science**, v. 104, n. 2, p. 215-224, 1995.
- BORGES, Neiliane Santiago Sombra; BENBADIS, Abdellatif K.; MARCO, Cláudia Araújo. Respostas morfo genéticas de tomateiro cultivado in vitro. **Revista Ciência Agronômica**, v. 36, n. 1, p. 91-97, 2005.
- LAIA, M. L. et al. CALDAS, LS; BUSO, JA Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. **UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO**, p. 17, 2015.
- 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.
- CAMPION, B.; ALLONI, C. Induction of haploid plants in onion (*Allium cepa* L.) by in vitro culture of unpollinated ovules. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 20, n. 1, p. 1-6, 1990.
- CAMPION, B.; BOHANEK, B.; JAVORNIK, B. Gynogenic lines of onion (*Allium cepa* L.): evidence of their homozygosity. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, n. 4, p. 598-602, 1995.
- CARNEIRO, Fernando dos Santos et al. Embriogênese somática em *Agave sisalana* Perrine: indução, caracterização anatômica e regeneração. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, p. 294-303, 2014.
- CASTRO, Lucas Siqueira; MIRANDA, Matheus Henrique; LIMA, João Eustáquio. Indicadores sociais de desenvolvimento e a produção de soja: uma análise multivariada nos 150 maiores municípios produtores brasileiros. **Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional**, v. 11, n. 1, 2015.
- CELEBI-TOPRAK, Fevziye; ALAN, Ali Ramazan. In Vitro Gynogenesis in Leek (*Allium ampeloprasum* L.). In: **Doubled Haploid Technology**. Humana, New York, NY, 2021. p. 171-184.
- 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.
- CID, L. Pedro Barreto; TEIXEIRA, J. B. Cultivo in vitro de plantas. **Brasília: Embrapa informação tecnológica**, 2010.
- CORDEIRO, Iracema Maria Castro Coimbra et al. Efeito de BAP sobre a proliferação de

brots in vitro de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (paricá). **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2004.

CORPES, Rosana Silva; SANTOS, Alberdan Silva. Influência dos Reguladores de Crescimento 2, 4-D e BAP associados aos agentes solidificantes Ágar e Phytigel na Indução de calos de *Crinum americanum* L.(Amaryllidaceae). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p, 2021.

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.

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.

DZIEDZIC, Jowita A.; MCDONALD, Armando G. Mass spectrometry data for in vitro protein profiles in early and late stages of Douglas-fir xylogenesis. **Data in brief**, v. 7, p. 1048-1051, 2016.

ECCO, Martios et al. Uso de diferentes tratamentos de bioestimulante vegetal na cultura da soja. **Revista Científica Rural**, v. 21, n. 2, p. 269-286, 2019.

FAGAN, Evandro Binotto et al. Fisiologia vegetal: reguladores vegetais. 2015.

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.

FERREIRA, Leticia Vanni et al. Indução de brotos in vitro em maracujazeiro doce BRSmel do cerrado. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 3, p. 9644-9652, 2020.

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.

GARCÍA FORTEA, Edgar. Evaluación de la competencia ginogénica de tres genotipos de cebolla (*Allium cepa*). 2017.

GARCIA, Renata et al. Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* L.(Passifloraceae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 106, n. 1, p. 47-54, 2011.

GEOFFRIAU, Emmanuel et al. Ploidy stability and in vitro chromosome doubling in gynogenic clones of onion (*Allium cepa* L.). **Plant Science**, v. 122, n. 2, p. 201-208, 1997.

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

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

GEORGE, Edwin F. et al. **Plant propagation by tissue culture. Part 2: in practice**. Exegetics limited, 1996.

GEORGE, Edwin F.; HALL, Michael A.; DE KLERK, Geert-Jan (Ed.). **Plant propagation by tissue culture: volume 1. the background**. Springer Science & Business Media, 2007.

GOELZER, Ademir et al. Reguladores de crescimento na multiplicação in vitro de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). **Brazilian Applied Science Review**, v. 3, n. 2, p. 1280-1291, 2019.

GOLLE, Diego Pascoal et al. Fitorreguladores e luminosidade na indução à calogênese em explantes foliares de *Eugenia involucrata* DC. **Ciência Florestal**, v. 30, p. 898-906, 2020.

GOSWAMI, Rupak; CHATTERJEE, Soumitra; PRASAD, Binoy. Farm types and their economic characterization in complex agro-ecosystems for informed extension intervention: study from coastal West Bengal, India. **Agricultural and Food Economics**, v. 2, n. 1, p. 1-24, 2014.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. How to observe the chromosomes: a guide to techniques in plant, animal and human cytogenetics. **Ribeirão Preto, SP, Brasil: FUNPEC**, 2002.

GUEYE, B. et al. Callogenesis and rhizogenesis in date palm leaf segments: are there similarities between the two auxin-induced pathways?. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 98, n. 1, p. 47-58, 2009.

HUSSEY, G. In vitro propagation of *Narcissus*. **Annals of Botany**, v. 49, n. 5, p. 707-719, 1982.

HYDE, Peter T.; EARLE, Elizabeth D.; MUTSCHLER, Martha A. Doubled haploid onion (*Allium cepa* L.) lines and their impact on hybrid performance. **HortScience**, v. 47, n. 12, p. 1690-1695, 2012.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em <https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/6588#resultado>. Acesso em Dezembro 10, 2021.

INÁCIO, Marielle Cascaes. Estudo agrônômico, químico e biológico de *Cochlospermum regium* (mart. ex. Scharank): uma planta medicinal do Cerrado. 2010.

JAKŠE, Marijana; BOHANEK, Borut; IHAN, Alojz. Effect of media components on the gynogenic regeneration of onion (*Allium cepa* L.) cultivars and analysis of regenerants. **Plant Cell Reports**, v. 15, n. 12, p. 934-938, 1996.

JAKŠE, Marijana et al. Evaluation of gynogenic responsiveness and pollen viability of selfed doubled haploid onion lines and chromosome doubling via somatic regeneration. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 135, n. 1, p. 67-73, 2010.

JUDKEVIÈIENĖ, D; STANYŠ, V; BOBINAS, E. 2005. Peculiaridades de ginogênese de vegetais *Allium L.* cultivados na Lituânia. *Biologia* 3.

KELLER, J. Culture of unpollinated ovules, ovaries, and flower buds in some species of the genus *Allium* and haploid induction via gynogenesis in onion (*Allium cepa L.*). **Euphytica**, v. 47, n. 3, p. 241-247, 1990.

LAVANYA, A. R. et al. Indirect organogenesis from various explants of *Hildegardia populifolia* (Roxb.) Schott & Endl.—A threatened tree species from Eastern Ghats of Tamil Nadu, India. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 95-101, 2014.

LEMOS, E.E.P. Organogênese. In: CID, L.P.B. (Org.). *Cultivo in vitro de plantas*. Brasília, **Embrapa**. 2010. p.103-127.

LEMOS, EEP. 2014. Organogênese. In Cid, L.P.B. *Cultivo in vitro de plantas*. 3.ed.ampliada, **Embrapa**. p. 106 -124.

COUVE-FLOR, E. M.; LONGO, ANA ELISA DE OLIVEIRA E. GINOGENESE EM CEBOLA E ANDROGENESE COM AVALIAÇÃO DE PROGÊNIES DE AUTOFECONDAÇÃO. 2013.

MARTÍNEZ, L. In vitro gynogenesis induction and doubled haploid production in onion (*Allium cepa L.*). In: **Doubled Haploid Production in Crop Plants**. Springer, Dordrecht, 2003. p. 275-279.

MARTINEZ, Liliana E. et al. Improvement of in vitro gynogenesis induction in onion (*Allium cepa L.*) using polyamines. **Plant Science**, v. 156, n. 2, p. 221-226, 2000.

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

MICHALIK, B. et al. Gynogenesis in Polish onion cultivars: effect of temperature during donor plant growth. In: **Biotechnological approaches for utilisation of gametic cells. COST 824: Final Meeting, Bled, Slovenia, 1-5 July 2000**. Office for Official Publications of the European Community, 2001. p. 91-94.

MISHRA, Vijay Kumar; GOSWAMI, R. Haploid production in higher plant. **Int J Chem Biol Sci**, v. 1, n. 1, p. 25-45, 2014.

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. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant** 15: 473-497.

MUREN, Roger C. Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion. **HortScience**, v. 24, n. 5, p. 833-834, 1989.

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

- MUSIAL, Krystyna et al. The development of onion (*Allium cepa* L.) embryo sacs invitro and gynogenesis induction in relation to flower size. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 41, n. 4, p. 446-452, 2005.
- PACHECO, Georgia et al. Plant regeneration, callus induction and establishment of cell suspension cultures of *Passiflora alata* Curtis. **Scientia Horticulturae**, v. 144, p. 42-47, 2012.
- PÊGO, Rogério Gomes; PAIVA, Patrícia Duarte de Oliveira; PAIVA, Renato. Micropropagation of *Syngonanthus elegantulus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 37, p.32-39, 2013.
- PÉREZ-TORNERO, Olaya et al. Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from in vitro cultured leaves of apricot. **Plant Science**, v. 158, n. 1-2, p.61-70, 2000.
- PETRI, José Luiz et al. Reguladores de crescimento para frutíferas de climatemperado. 2016..
- PIZA, IM de T.; LIMA, G. P. P.; BRASIL, O. G. Reguladores vegetais na micropropagação do abacaxizeiro. **Revista Ceres**, v. 48, n. 280, p. 681-690, 2001.
- PONCE, MT. 2007. Ginogénesis en cebolla. **Avances en Horticultura** 5: 1-12.
- FOSCHI, M. et al. Doblehaploides, una estrategia biotecnológica para el mejoramiento genético en cebolla (*Allium cepa*). **Hortic. Argent**, v. 28, p. 40-48, 2009.
- RADMANN, Elizete Beatriz; GONÇALVES, Emerson Dias; FORTES, Gerson Renan de Lucas. 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, p. 124-126, 2003.
- RAGASSI, Carlos Francisco et al. Genotipagem de polimorfismos associados com sistemas de macho-esterilidade em acessos de cebola adaptados ao Brasil. **Horticultura Brasileira**, v. 30, p. 409-414, 2012.
- RASOOL, S. N. et al. In vitro callus induction and in vivo antioxidant activity of *Passiflora foetida* L. leaves. **International Journal of Applied research in natural Products**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2011.
- RAVEN PH, RAY EF, EICHHO R.N. (2012). **Biologia Vegetal**. 8 o edição. Rio deJaneira. Editora Guanabara. 739p.
- REED, Sandra M. Haploid cultures. In: **Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises**. Routledge, 2018. p. 285-290.
- ROSA, Yara Brito Chaim Jardim; BELLO, Carolina Cassano Monte; DORNELAS, Marcelo Carnier. Species-dependent divergent responses to in vitro somatic embryo induction in *Passiflora* spp. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 120, n. 1, p. 69-77, 2015.
- SANTOS, Jandeilson P. dos et al. Performance of onion cultivars as a function of spacing

- between plants. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.22, p. 212-217, 2018.
- SATO, Aurora Yoshiko et al. Influência do ácido abscísico na micropropagação da cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 23,p. 1235-1237, 2001.
- SCHWERTNER, A. B. S. et al. Efeito do 6-benzilaminopurina (BAP) e do ácidoindolacético (AIA) na propagação in vitro da caapeba [*Pothomorphe peltata* (L.) Miq.]. **Braz J Med Plants**, v. 10, p. 76-81, 2008.
- SEABROOK, JEA. Narcissus (Daffodil). 1990. In: AMMIRATO, P. et al, (Eds). Handbook of Plant Cell Culture. Ornamental Species. **New York: McGraw-Hill**. p577-597.
- SEIGNER, E. Conventional cultivation and biotechnology join forces on the way to healthy plants. Anther cultivation/ovary cultivation. **Monatsschrift fuer Brauwissenschaft (Germany, FR)**, 1992.
- SILVA, Daniella Mota et al. Efeito das auxinas ácido naftaleno acético e ácido indolbutírico no desenvolvimento in vitro de plântulas de *Cyrtopodium saintlegerianum* Rchb. f.(orchidaceae). 2013.
- SILVA, M. M. A.; FERREIRA, L. T. Cultivo in vitro de plantas e suas aplicações em cactáceas. **Instituto Nacional do Semiárido**, v. 1, 2016.
- SOORNI, Jahad; KAHIRIZI, Danial. Effect of genotype, explant type and 2, 4-D on cell dedifferentiation and callus induction in cumin (*Cuminum cyminum* L.) medicinal plant. **Journal of Applied Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3, p. 265-270, 2015.
- 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.
- TAIZ, Lincoln et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.
- VIEIRA, Renato Luis et al. Morfogênese de plantas de alho in vitro: papel dos reguladores de crescimento na indução e desenvolvimento de bulbos. **Ciência Rural**, v.44, p. 439-445, 2014.
- 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.
- FAIKA, Yarali; RUHSAR, Yanmaz. 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.
- CHAI, Kian Yew et al. The effect of cytokinins on in vitro shoot length and multiplication of *Hymenocallis littoralis*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4,n. 24, p. 2641-2646, 2010.

YURI, Jony Eishi; COSTA, Nivaldo Duarte; DE RESENDE, Geraldo Milanez. Características produtivas de cultivares de cebola no Submédio do Vale do São Francisco. 2019.

## **CAPÍTULO II: Efeito de meios suplementados com poliaminas na indução de embriões ginogênicos em cebola**

### **RESUMO**

A obtenção de plantas haploides e duplo-haploides através do cultivo *in vitro* de gametas é reconhecida como uma valiosa ferramenta, que auxiliam e acelera o processo de gerar linhas homozigotas de culturas alógamas como no caso da cultura estudada *Allium cepa* L., que apresentam dificuldade para autofecundação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade ginogênica de duas variedades de cebola *in vitro* em meios suplementados com poliaminas e reguladores de crescimento. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2. Os tratamentos consistiram em duas variedades de cebola IPA 11 e BRS Alfa São Francisco, cultivadas em dois protocolos A e B. O protocolo descrito por Michalik, botões florais foram inoculados em meio BDS suplementado com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4 D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose onde ficaram por 15 dias. Após esse período, fez-se o subcultivo em meio de regeneração (BDS) suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de KIN e 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Após 30 dias o embrião foi subcultivado em meio MS sem reguladores de crescimento e suplementado com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose até o desenvolvimento da plântula. No protocolo descrito por Adhiyamaan, botões florais foram inoculados em meio BDS suplementado com 100g de sacarose e 2mM de putrescina filtrada e esterilizada, onde ficaram por 15 dias, em seguida, foram subcultivados em meio de regeneração (BDS) suplementado com 0,01mM de spermidina, por um período de 30 dias, onde os embriões foram transferidos para meio MS, suplementado com 40g de sacarose e livre de reguladores de crescimento até o desenvolvimento da plântula. As variáveis analisadas foram: NC – número de calo, NEMB - número de embrião formado, BRV - botões vitrificados, QBV - botões viáveis, PLC - placas contaminadas, CL% - porcentagem de calo formado, NPR - número de plantas. Os dados foram submetidos a análise de variância e quando houve diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Com o protocolo o qual o meio foi suplementado com poliaminas, elas promoveram maior eficiência na indução de embriões ginogênicos para as variedades IPA 11, assim como também evidenciou maior número de calos, menor oxidação dos explantes, os botões florais que se evidenciaram mais responsivos foram aqueles que estavam na presença de poliaminas obtendo plantas regeneradas, com maiores números de raízes.

**Palavras-chave:** putrescina; spermidina; embriogênese.

## **Effect of using media supplemented with polyamines on the induction of gygenic embryos in onion**

### **ABSTRACT**

Obtaining haploid and double-haploid plants through the in vitro culture of gametes is recognized as a valuable tool, which helps and accelerates the process of generating homozygous lines of allogamous cultures, as in the case of the studied culture *Allium cepa* L., which presents difficulty for self-fertilization. The objective of this work was to evaluate the gygenic capacity of two varieties of onion in vitro in media supplemented with polyamines and growth regulators. The experiment was carried out in a completely randomized design, in a 2 x 2 factorial scheme. The treatments consisted of two onion varieties IPA 11 and BRS Alfa São Francisco, cultivated in two protocols A and B. The protocol described by Michalik, flower buds were inoculated in BDS medium supplemented with 2.0 mg.L<sup>-1</sup> of 2.4 D and 2.0 mg.L<sup>-1</sup> of BAP and 100 g.L<sup>-1</sup> of sucrose where they remained for 15 days. After this period, subculture was performed in regeneration medium (BDS) supplemented with 1.0 mg.L<sup>-1</sup> of NAA and 2.0 mg.L<sup>-1</sup> of KIN and 100g.L<sup>-1</sup> of sucrose. After 30 days, the embryo was subcultured in MS medium without growth regulators and supplemented with 30 g.L<sup>-1</sup> of sucrose until seedling development. In the protocol described by Adhiyamaan, flower buds were inoculated in BDS medium supplemented with 100g of sucrose and 2mM of filter-sterilized putrescine, where they remained for 15 days, then were subcultured in regeneration medium (BDS) supplemented with 0.01mM of spermidine, for a period of 30 days, where the embryos were transferred to MS medium, supplemented with 40g of sucrose and free of growth regulators until seedling development. The variables analyzed were: NC – number of callus, NEMB – number of formed embryos, BRV – vitrified buds, QBV – viable buds, PLC – contaminated plates, CL% – percentage of formed callus, NPR – number of plants. Data were submitted to analysis of variance and when there were significant differences, means were compared using the Scott Knott test at a 5% probability level. With the protocol in which the medium was supplemented with polyamines, they promoted greater efficiency in the induction of gynogenic embryos for the IPA 11 variety, as well as showing a greater number of calluses, less oxidation of the explants, the flower buds that were more responsive were those that did were in the presence of polyamines, obtaining regenerated plants, with greater numbers of roots.

**Keywords:** putrescine; spermidine; embryogenesis.

## 1 INTRODUÇÃO

A cebola é a espécie do gênero *Allium* mais cultivada, comercializada e consumida. Apresentam uma diversidade de usos, culinários (vegetais, temperos e alimentos), medicinais e farmacológicos (ARSHAD et al., 2017). É cultivada em mais de 175 países em todo o mundo, cobrindo 5,2 milhões de hectares com uma produção total de 97,4 milhões de toneladas anuais (FAOSTAT, 2020).

A cebola cultivada é derivada da semente de variedades de polinização aberta (OPVs) ou híbrida (Nunes et al., 2014). Melhoristas utilizam linhagens parentais homozigotas para criar híbridos superiores ou sintéticos de cebolas. Os híbridos têm sido mais úteis do que as variedades de polinização aberta, devido aos altos rendimentos e uniformidade para características hortícolas importantes, como cor, tamanho, forma e dias de maturação do bulbo em comparação com OPVs (JOSHI & TANDON, 1976). No entanto, inúmeras dificuldades afetam o desenvolvimento de linhagens homozigotas em cebola usando abordagens convencionais sendo a principal a incompatibilidade gametofítica.

A ginogênese em flores não polinizadas tem sido uma das principais formas para a produção de haplóide de cebola e subsequente duplicação cromossômica e assim obter plantas homozigóticas para todos os locos e em seguida ter a produção de híbrido os quais vem oferecendo uma abordagem de economia de tempo para obter linhagens puras (DUNWELL, 2010; CHEN et al., 2011).

Para incluir protocolos de ginogênese em programas de melhoramento é necessário avaliar genótipos, otimização de diferentes condições de laboratório, disponibilidade de protocolos de laboratório para a produção de haploide e posteriormente fazer a sua duplicação, para que se tenha a oportunidade de se ter uma planta completamente homozigota e estável (YARALI & YANMAZ, 2017).

A utilização de poliaminas (PAs) como espermidina (Spd) e putrescine (Put), quais são compostos de baixo peso molecular e que afetam todos os aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas. As PAs ocorrem naturalmente em altas concentrações em flores

e outros órgãos (TIBURCIO et al., 2014), e, em meios de cultura, são conhecidos por participarem da regulação da embriogênese gamética (CHIANCONE et al., 2015; AHMADI et al., 2014). Em cebola, altas frequências de regeneração embriogênica e de plântulas foram relatadas em genótipos iranianos cultivados em meio suplementado com putrescina e espermidina (EBRAHIMI & ZAMANI, 2009). Em cultura de tecidos, as poliaminas vêm sendo utilizadas como reguladores vegetais, buscando-se sempre obter diversos tipos de respostas, tais como embriogênese (YADAV & RAJAM, 1997) e enraizamento (RUGINI, 1992). São atribuídos a estas substâncias efeitos antioxidantes, exercendo proteção às células, incluindo membranas, ácidos nucléicos e ácidos graxos polinsaturados de danos oxidativos (LOVAAS, 1997). Segundo LOVAAS (1997), as poliaminas atuam como quelantes de metais, diminuindo sua ação oxidativa nas células.

Baseados nas descrições dos efeitos das poliaminas combinadas com reguladores de crescimento sobre a indução de embriões ginogênicos cabem estudos que integrem estas informações a respeito de protocolos eficientes que interajam os processos indutivos com outras substâncias que controlam a fisiologia do desenvolvimento do embrião (YADAV & RAJAM, 1997). Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade ginogênica de duas variedades de cebola *in vitro* em meios suplementados com poliaminas e reguladores de crescimento.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi realizado utilizando dois protocolos: protocolo Michalik utilizou auxinas e citocininas para o subcultivo e o protocolo Adhiyamaan utilizou poliaminas (putrescina e espermidina) para o subcultivo sendo os dois protocolos realizados em duas etapas de cultivo para a indução.

### **2.1 Local do experimento**

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal localizado no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Areia-PB.

### **2.2 Material vegetal**

Utilizou-se bulbos vernalizados de cebola (*Allium cepa* L.) da cultivar IPA-11 e BRS Alfa São Francisco, para obtenção de umbelas. Bulbos vernalizados foram plantados em casa de vegetação no laboratório de biotecnologia, quando as plantas emitiram as inflorescências,

foram coletadas próximo da antese, colocadas em caixa de isopor e armazenadas em freezer (4-8° C) para manterem a capacidade ginogênica por pelo menos um dia e no máximo uma semana, utilizou-se umbelas fechadas com botões florais grandes e médios, pesando cerca de 0,040 g e com tamanho de 7 mm, e 0,030 g e/ou  $\geq 4$  mm, respectivamente (LONGO, 2013).

### 2.3 Meio de indução

Utilizou-se dois protocolos de indução, protocolo descrito por Michalik et al., (2000), onde botões florais foram inoculados em meio BDS suplementado com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4 D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose onde ficaram por 15 dias. Após esse período fez-se o subcultivo em meio de regeneração (BDS) suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de ANA e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de KIN e 100g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Os embriões foram subcultivados por um período de 30 dias em meio MS sem reguladores de crescimento e suplementado com 30g.L<sup>-1</sup> de sacarose até o desenvolvimento da plântula.

No protocolo descrito por Adhiyamaan et al., (2019) com modificações, botões florais foram inoculados em meio BDS suplementado com 100g de sacarose e 2mM de putrescina filtroesterelizado, onde ficaram por 15 dias, em seguida, foram subcultivado em meio de regeneração (BDS) suplementado com 0,01mM de spermidina, por um período de 30 dias, onde os embriões foram transferidos para meio MS, suplementado com 40g de sacarose e livre de reguladores de crescimento até o desenvolvimento da plântula.

Os meios de cultura tiveram o pH ajustado para 5,8 antes de adicionar 7g.L<sup>-1</sup> de agár, agente geleificante em seguida o meio foi esterilizados em autoclave à temperatura de 120°C e pressão de 1 kgf/cm<sup>-2</sup> durante 15 min.

### 2.4 Obtenção de embriões

Em fluxo laminar, foi realizada a desinfestação dos botões florais realizada com 100 mL de álcool 70% por 3 minutos, colocados em 100 mL solução de hipoclorito de sódio (2% de cloro ativo) adicionando-se 3 gotas de Tween 20, permanecendo imersos nesta solução por 15 min. Posteriormente, os botões foram lavados três vezes em água destilada e deionizada e autoclavada (DDA).

Após a desinfestação dos botões florais, realizou-se a inoculação em placas de Petri descartáveis de 90x15 mm, contendo 15 ml do meio de cultura BDS - Dunstan e Short (1997)

utilizado para indução de embriões, em cada placa foi inoculado 10 botões fechados. As placas com os botões foram transferidas para sala de crescimento, mantidos sob controle de temperatura, 8 horas de 27°C e 16 horas de 24°C.

### **2.5 Regeneração e aclimação**

Após um período de 30 dias os botões viáveis e os embriões ginogênicos foram transferidos para potes de vidro contendo meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962), acrescido 30 g L<sup>-1</sup> de sacarose, com a adição de ágar e sem reguladores de crescimento. Após a troca de meio BDS para o MS realizou-se as caracterizações. As características avaliadas foram; NC – número de calo, NEMB - número de embrião formado, BRV - botões vitrificados, QBV - botões viáveis, PLC - placas contaminadas, CL% - porcentagem de calo formado e NPR - número de plantas. O meio era renovado a cada 30 dias.

As plântulas que cresceram *in vitro* e que apresentaram de 3 a 4 folhas em meio MS, foram transplantados para copos descartáveis de 7,0 cm contendo substrato comercial e vermiculita (1:1), cobertos com sacolas plásticas, mantidos dentro de uma câmara de crescimento adaptada (para terem uma adaptação do ambiente externo), após um mês as plântulas que já estavam adaptadas foram transplantadas para vasos de 11 cm com o mesmo substrato.

### **2.6 Análise estatística**

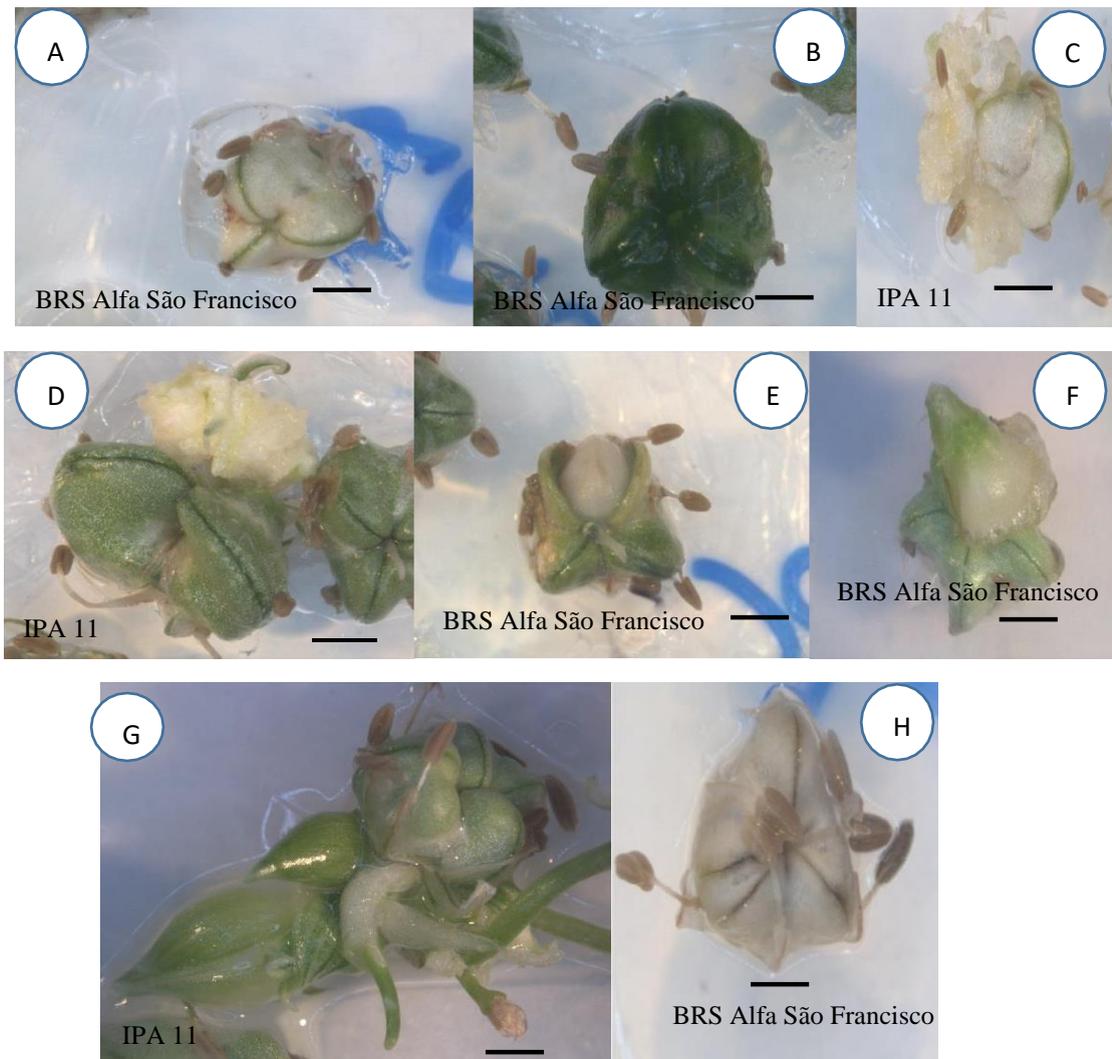
O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (2 x 2), onde utilizou-se dois protocolos diferentes (Michalik e Adhiyamaan) e duas variedades de cebola (IPA 11 e BRS Alfa São Francisco ). Cada tratamento foi repetido sete vezes, com cada placa contendo 10 botões que constituindo uma repetição, os dados foram submetidos à análise de variância e teste de média Scott-Knott, utilizou-se o programa computacional R Studio.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Com a inoculação dos botões florais não polinizados, nos meios de cultura dos protocolos Michalik e Adhiyamaan pode se observar que para a protocolo Michalik avaliados nos primeiros 15 dias os botões florais aumentaram de tamanho e mudaram de coloração passando de verde claro para verde mais escuro (Fig. 1A – 1B). Cerca de três semanas e meia de cultivo no protocolo Michalik, as duas variedades IPA 11 e BRS Alfa São Francisco,

observou-se formação de calos basais nos botões inoculados e deiscência dos ovários, tendo a formação de embriões ginogênicos (Figuras 1C-1G).

Ainda para o protocolo descrito por Michalik observou-se que aos 35 dias os botões florais que não tiveram deiscência, escureceram, ficando com um tom branco acinzentado e morreram tendo-se uma maior perda de botões florais (Fig. 1H), a causa desse fenômeno pode ser explicado devido à ausência de concentração osmótica adequada que é fundamental para obter resultados satisfatórios quando ocorre esse desequilíbrio tem-se a morte de botões devido as baixas e as altas concentrações de agentes osmóticos que agem para indução de embriões. Doses elevadas podem desregular o metabolismo das plantas, promover alterações na permeabilidade da membrana e também aumentar o estresse oxidativo, resultando em lesão tecidual (GUPTA et al., 2017).



**Figura 1.** Indução e regeneração embriões ginogênicos de (*Allium cepa* L.) no meio

Michalik e Adhiyamaan. A e B, mudança de cor do botão floral na BRS Alfa São Francisco. C e D, além da mudança na cor do botão floral houve também a formação de calos na cultivar IPA-11. E e F, ruptura do botão floral e o surgimento do embrião ginogênico da cultivar BRS Alfa São Francisco. G. Embriões ginogênicos regenerados da cultivar BRS Alfa São Francisco. H. Botão floral necrosado ou não responsivo de IPA-11. suplementado com Barra = 1cm. Fonte: RODRIGUES, C.A.P.S, (2022).

Quanto ao desenvolvimento *in vitro* dos botões florais das duas variedades IPA 11 e BRS Alfa São Francisco no protocolo descrito por Adhiyamaan, observou-se maior quantidade de estádio em 30 dias de cultivo. Apresentando inicialmente o mesmo comportamento de intumescimento, mudança de coloração e formação de calos que ocorreu aos 25 dias de cultivo, também se observou brotações que emergiam do interior do ovário para a variedade BRS Alfa São Francisco (Figura 2A, 2B e 2C), formação de uma umbela dentro da placa.

Enquanto para a variedade IPA 11, observa-se a deiscência do ovário e em seguida a formação do embrião com coloração verde escura (Figura 2D, 2E e 2F). Em algumas placas da variedade BRS Alfa São Francisco, observou-se a formação diretamente de bulbos sem que houvesse a formação de umbela ou calos (Figura 2G, 2H, 2I e 2J), teve-se também formação de sementes *in vitro* (Figura 2L).

Para a variedade IPA 11 a formação de bulbos também foi observada para o meio de regeneração não tendo a coloração amarela típica do genótipo, mantendo-se verde (Fig.2M). A variedade BRS Alfa São Francisco quando transferida para o meio de regeneração obteve maior desempenho com raízes bem mais desenvolvidas e com bulbos uniformes além de apresentar maior quantidade de folhas (Fig. 2N e 2U). O desenvolvimento de raízes, a iniciação e o desenvolvimento floral, a frutificação, a tuberização, e a senescência são processos nos quais as poliaminas podem estar envolvidas.

A regeneração de plantas *in vitro* pode acontecer por uma variedade de formas, entre elas a partir de uma única célula somática (SUGIMOTO et al., 2011). Da mesma forma que na indução de calos, para ocorrer à regeneração em plantas é necessário o correto equilíbrio dos reguladores vegetais nos meios de cultura, sendo primordial a relação ideal entre auxinas e citocininas (BERNULA et al., 2020).

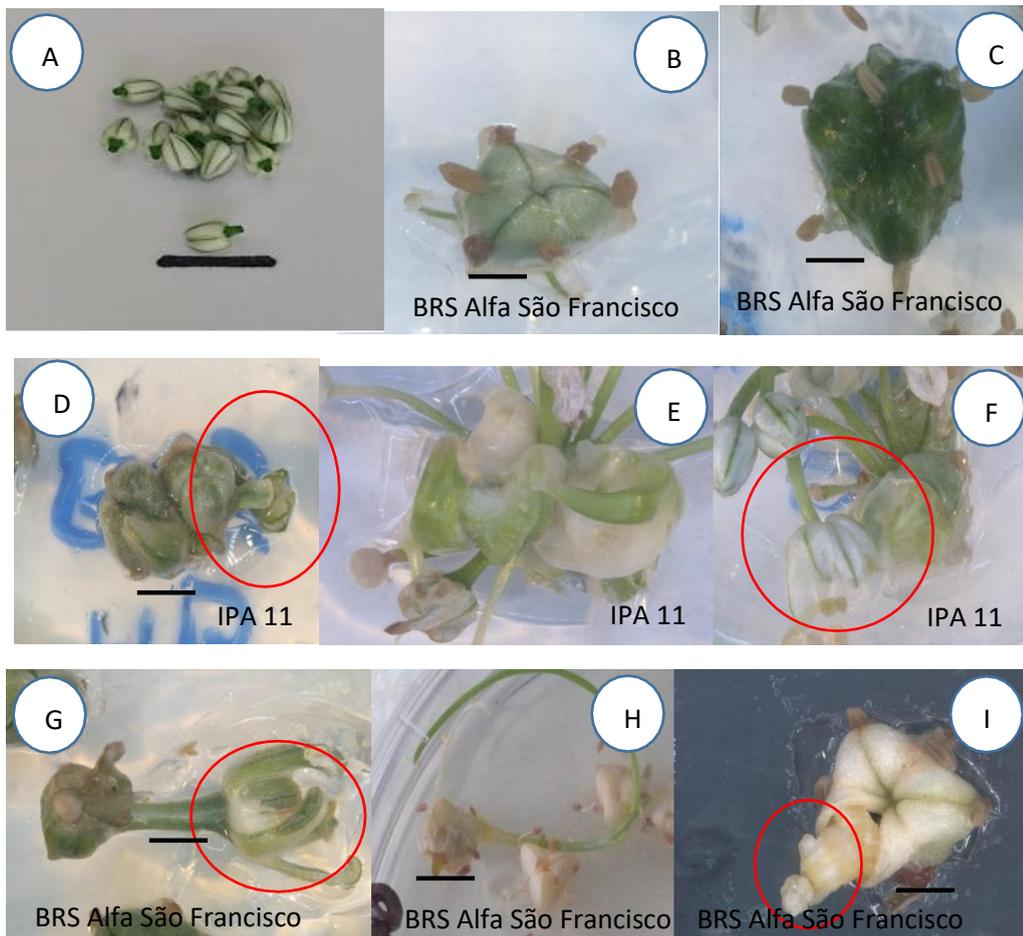
No cultivo *in vitro* para otimizar os processos metabólicos é comum a adição de reguladores de crescimento ao meio de cultura (SANTOS et al., 2019).

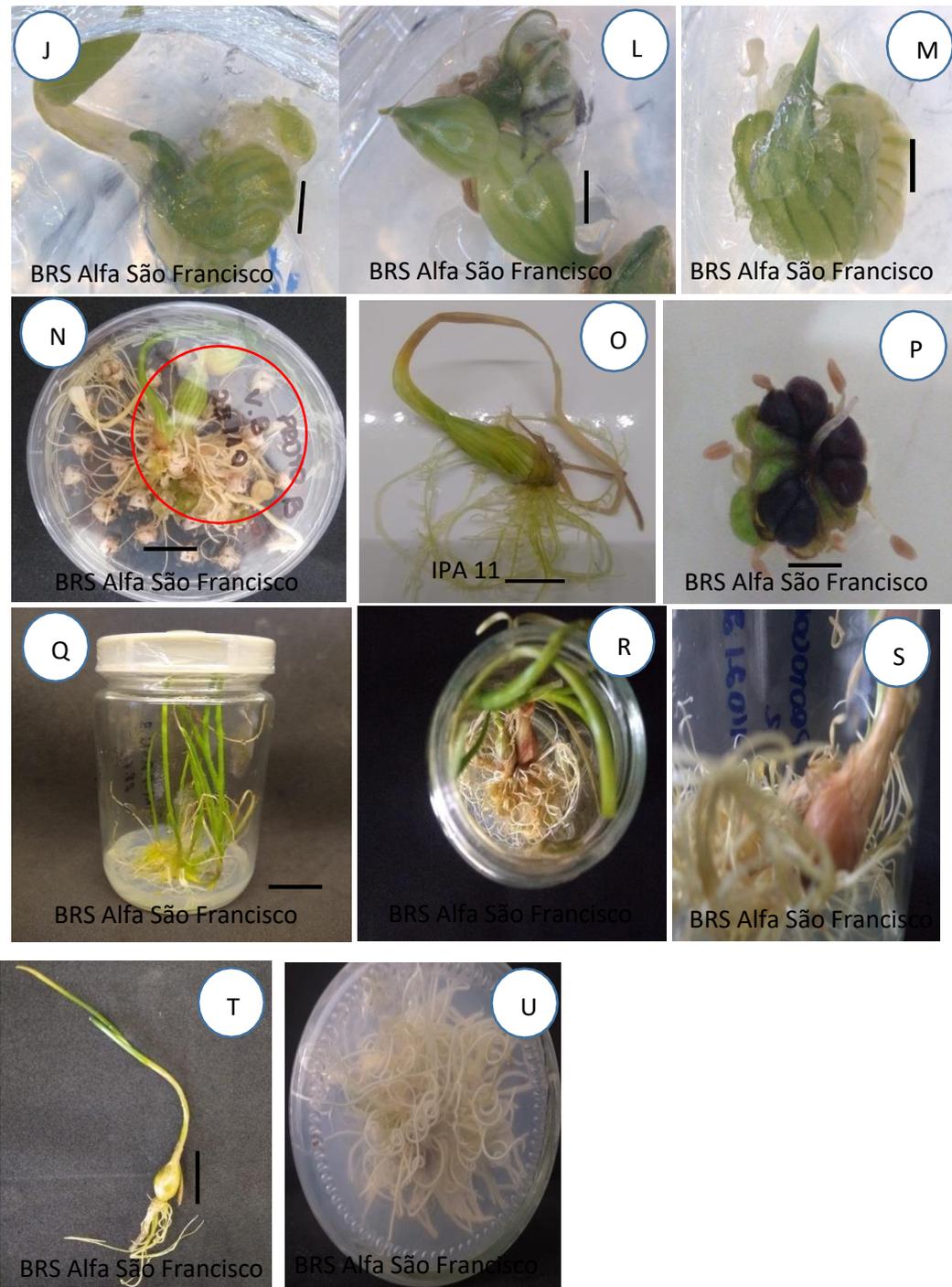
Vários modelos sugerem que as poliaminas Spd (espermidina) e Spm (espermina), junto com outros componentes da célula, como as histonas, contribuam com mudanças nas conformações do DNA, promovendo estabilização das duplas hélices, determinando as

estruturas secundárias e terciárias do ácido nucléico espermidina e espermina, assim como seu precursor, a diamina putrescina, são policátions e estão relacionadas com a regulação da divisão celular, diferenciação e na morfogênese (GALSTON & KAURSAWHNEY, 1995).

As poliaminas são consideradas reguladores do crescimento das plantas, atuam em muitos processos fisiológicos como na morfogênese, no desenvolvimento de órgãos, respostas ao estresse, crescimento, senescência foliar, sinalização e proliferação celular.

Para a variedade IPA 11 não se observou maiores desenvolvimento de bulbos, os bulbos formados eram tenros e permaneceram imaturos com cavidades esverdeadas e com raízes poucas desenvolvidas, assim como também não apresentavam números de folhas suficientes para serem transplantadas e aclimatizadas.





**Figura 2.** Processo de formação e desenvolvimento de indução de embriões ginogênicos (*Allium cepa* L.) no meio Adhiyamaan meio suplementado com poliaminas 2mM de putrescina e 0,01mMde spermidina. Barra 1cm.( RODRIGUES, C.A.P.S).

De acordo com os dados da Tabela 1, observaram-se diferenças significativas, pelo teste F, a ( $p \leq 0.1$ ) e ( $p \leq 0.05$ ), em quase todas as variáveis estudadas, tendo a exceção para a variável, placas contaminadas (PLC) e número de plantas regeneradas (NPR). Para os protocolos avaliados observaram-se níveis de significância para número de embriões e

número de plantas regeneradas ( $p \leq 0.05$ ). Verificou interação significativa ( $p \leq 0.05$ ) entre variedades x protocolos, indicando efeito adicional devido à ação conjunta dos fatores, para as variáveis número de calo e número de embriões formados.

**Tabela 1.** Resumo da análise de variância (quadrados médios) da influência de dois protocolos na regeneração *in vitro* de embriões ginogênicos de *A. cepa* L, variedades IPA11 e BRS Alfa São Francisco

F.V.	L	QM						
		NC	NEMB	BRV	QBV	PLC	CL%	PR
<b>VAR</b>		7.225**	1.600**	180.62**	184.9**	0.1ns	1837.5*	.90 <sup>ns</sup>
<b>PROT</b>		1.225 <sup>ns</sup>	0.900*	13.22 <sup>ns</sup>	10.00 <sup>ns</sup>	0.1 <sup>ns</sup>	387.2 <sup>ns</sup>	.60*
<b>VAR*PROT</b>		3.025*	0.900*	5.625 <sup>ns</sup>	3.60 <sup>ns</sup>	0.1 <sup>ns</sup>	713.1 <sup>ns</sup>	.90 <sup>ns</sup>
<b>RESÍDUO</b>	6	0.625	0.138	8.52	8.29	0.1	271.6	.25
<b>TOTAL</b>	9	22.500	8.4	506.37	497.1	3.9	12715.3	2.4
<b>CV%</b>		150.58	186.34	93.43	42.04	632.46	208.91	50

NC – Número de calo, NEMB- número de embrião formado, BRV- botões vitrificados, QBV- quantidade de botões viáveis, PLC- placas contaminadas, CL%- porcentagem de calo formado, NPR- número de plantas regeneradas ns, \*, \*\*: Não significativo e significativo a ( $p \leq 0.05$ ) e ( $p \leq 0.1$ ) respectivamente, pelo teste F.

De acordo com o teste de média Scott-Knot observou-se que para o fator variedades o teste de média (Tabela 2) teve feito apenas para a variável botões vitrificados (BRV), botões viáveis (QBV), e porcentagem de placas contaminadas (CL%) enquanto para fator protocolos observou-se efeito apenas a variável número de plantas regeneradas (NPR). Quanto os efeitos de forma isolada, tem-se que a variedade BRS Alfa São Francisco, apresentou um maior valor médio para a variável, quantidade de botões viáveis, comparadas com a variedade IPA 11.

Em outros estudos no qual a variedade IPA11 foi testada *in vitro* observou-se que ela apresentou resultados iguais a BRS Alfa São Francisco, sendo, portanto, alcançada essas respostas, devido as combinações de auxinas e citocininas em quantidades satisfatórias para indução de resposta de embriões ginogênicos.

Quando o meio é suplementado com poliaminas e usa-se o subcultivo na indução de

embriões ginogênicos para a variedade BRS Alfa São Francisco, ela apresenta respostas superiores de indução quando comparado com meio que foi suplementado apenas com auxinas e citocininas.

Quanto aos protocolos, observa-se diferença significativa apenas para número de plantas regeneradas onde o protocolo Adhiyamaan, apresentou efeito significativo para a variável, plantas regeneradas, esse efeito deve-se as poliaminas, que é uma classe de reguladores também usados *in vitro* que estão relacionadas ao crescimento das plantas e têm efeitos semelhantes às auxinas na divisão e alongamento células. Erland & Mahmoud, (2014) relataram que os principais efeitos *in vitro* dessas substâncias estão envolvidos na regulação da formação de brotos adventícios, divisão celular, floração, formação de embriões e formação de novos órgãos (TASSONI et al., 2000).

Os parâmetros internos da planta, como características fisiológicas, hormonais, estádios de desenvolvimento, bem como as condições do meio afetam os teores endógenos das poliaminas podendo esses ter efeitos positivos e negativos no seu uso, como por exemplo, elas podem inibir o desenvolvimento do explante cultivado, causandoum efeito de verificação (BOCHEREAU et al., 1999). A putrescina atua em fases específicas do ciclo celular, sendo, portanto, necessária para a replicação do DNA. Dessaforma, as poliaminas têm sido indicadas como atuantes em muitos eventos celulares (TASSONI et al., 2000).

Podemos prever que as poliaminas presentes nesse meio de cultivo foi eficiente na regeneração de plântulas, pois ele teve um maior valor médio que fez a diferença quando comparada com o outro meio o qual foi suplementado apenas com hormônios. WALDEN et al. (1997) concluíram que a morfologia de folhas, o crescimento de calos e a de formação de plântula *in vitro* em meios suplementados com doses de poliaminas, influenciam em modificações endógenas no cultivo de plântulas. Resultados semelhantes que corroboram com essa pesquisa foram descritos por NISHIBORI & NISHIJIMA (2004), em tabaco, onde a auxina e a citocinina aceleram o crescimento dos explantes, ativando a biossíntese de poliaminas nos tecidos iniciais ao desenvolvimento da planta.

**Tabela.** Teste de média na indução de embriões ginogênicos *in vitro* de *Allium cepa* L. Variedade IPA-11 e BRS Alfa São Francisco.

	QBV	BV	PLC	CL%	NPR
<b>Variedades</b>					
IPA 11	1,00b	9,00a	0,10a	14,66 <sup>a</sup>	0,35a
BRS	5,25a	4,70b	0,10a	1,11b	0,05a
<b>PROT</b>					
Michalik	3,70a	6,35a	0,10a	4,77a	0,1b
Adhiyamaan	2,55a	7,35a	0,10a	11,00a	0,4a

(QBV) - quantidade de botões vitrificados; (BV) - botões viáveis, (PLC) - placas contaminadas; (CL%) porcentagem de calos formados e (NPR) - Número de plantas regeneradas. Médias seguidas com mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Analisando o efeito das variedades nos protocolos utilizados observa-se que não houve influência do protocolo Michalik nas variedades (IPA11 e BRS Alfa São Francisco) (Tabela 3). O protocolo Adhiyamaan, apresentou melhor desempenho no cultivar IPA 11 para as características número de calo e número de embriões. Enquanto a variedade BRS Alfa São Francisco não houve diferença significativa para essa variável em função dos protocolos testados. Sendo, portanto, a variedade IPA 11 a mais responsiva para a indução de embriões de forma direta e indireta no protocolo Adhiyamaan.

A formação do número de calo e indução no número de embriões tiveram influência das poliaminas, provavelmente devido interação das poliaminas com a cultivar, que favoreceu o desenvolvimento celular. Galston & Kaur-Sawhney (1990) citam que as poliaminas têm papel vital na mediação da ação de reguladores e divisão celular, entre outras funções. Esse crescimento dos calos, promovido pela presença de poliaminas, pode ser atribuído ao efeito protetor das poliaminas quando adicionadas exogenamente, agindo contra o estresse oxidativo que o meio de cultivo gera ao explante (TANG et al., 2004).

As poliaminas podem exercer diferentes efeitos na embriogênese (CHENG et al., 2015), positivos e inibitórios (TAKEDA et al., 2002), a depender da espécie, condições de cultivo (REIS et al., 2016), poliamina em questão, concentração (YADAV; RAJAM, 1997) e tempo de exposição do explante ao determinado composto (AHMADI et al., 2014). Os efeitos fisiológicos das poliaminas na embriogênese ainda continuam pouco

elucidados (CHENG et al., 2015; REIS et al., 2016), sendo comumente relacionados à divisão celular (PAUL; MITTER; RAYCHAUDHURI, 2009) e rápido crescimento (KACKAR; SHEKHAWAT, 2007), alongamento celular e desenvolvimento de centros meristemáticos (CVIKROVÁ et al., 1998) e proteção contra o ambiente estressante *in vitro* (REIS et al., 2016).

Meios de cultivo BDS, suplementados com poliaminas tem baixa oxidação de explantes no cultivo *in vitro* de embriões ginogênicos além de apresentarem plântulas com sistema radiculares mais desenvolvidos e vigor de plântulas.

Protocolos que apresentam etapas de subcultivo apresentam maior taxa de contaminação e como consequência maior perda de material, portanto indica-se que para a indução de embriões ginogênicos utilize-se menos etapa de cultivo do embrião

**Tabela 3.** Desdobramento da interação para as médias da indução de embriões ginogênicos *in vitro* de *Allium cepa* L. Variedade IPA-11 e BRS Alfa São Francisco, utilizando dois protocolos diferentes.

	NC		NEMB	
	IPA 11	BRS	IPA 11	BRS
Michalik	0,5Ab	0,2Aa	0,1Ab	0,1Aa
Adhiyamaan	1,4Aa	0,1Ba	0,7Aa	0,1Ba

(NC) - número de calo; (NEMB) - número de embriões. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na horizontal e minúscula na vertical não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

#### 4 CONCLUSÃO

Em cebola, o meio de indução para ginogênese na variedade IPA 11, devem ser suplementados por poliaminas (putrescina e spermidina), pois as poliaminas aumentam a capacidade de formação de embriões ginogênicos. Já os meios de cultura com duas etapas de cultivo e suplementado apenas com reguladores de crescimento (auxinas e citocininas) não são indicados para indução de embriões e de bulbos *in vitro*.

Enquanto para a variedade BRS Alfa São Francisco meios suplementados com doses reguladores de crescimento (auxinas e citocininas) induzem a formação de embriões e na formação direta de bulbos.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, Camila Camargo et al. Análise das características da agricultura familiar no município de Erval Velho, SC. **Unoesc & Ciência-ACSA**, v. 8, n. 1, p. 15-24, 2017.
- AHMADI, Behzad; EBRAHIMZADEH, Hamed. In vitro androgenesis: Spontaneous vs. artificial genome doubling and characterization of regenerants. **Plant cell reports**, v. 39, n. 3, p. 299-316, 2020.
- ALAN, Ali R. et al. Fecund gynogenic lines from onion (*Allium cepa* L.) breeding materials. **Plant science**, v. 167, n. 5, p. 1055-1066, 2004.
- ALAN, Ali 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.
- ASCOUGH, Glendon D.; VAN STADEN, Johannes; ERWIN, John E. In vitro storage organ formation of ornamental geophytes. **HORTICULTURAL REVIEWS- WESTPORT THEN NEW YORK-**, v. 34, p. 417, 2008.
- BHAT, Supriya V. et al. *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 adapts to 2, 4 dichlorophenoxyacetic acid with “auxin-like” morphological changes, cell envelope remodeling and upregulation of central metabolic pathways. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0123813, 2015.
- BOEING, G. (2002). Fatores que afetam a qualidade da cebola na agricultura familiar catarinense (pp. 80-p). Instituto Cepa-SC 2002.
- BOHANEK B, JAKŠE M, IHAN A, JAVORNIK B. Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.) induction procedures and genetic analysis of regenerants. *Plant Sci* 104:215–224. 1995
- BOHANEK B. Doubled haploid onions. In: Rabinowitch HD, Currah L (eds) *Allium crop science: recent advances*. CABI Publishing House, Wallingford, pp 145–158, 2002.
- BORÉM, Aluízio; MIRANDA, Glauco V.; FRITSCHÉ-NETO, ROBERTO. Melhoramento de plantas. Oficina de Textos, 2021.
- CAMPION, B.; BOHANEK, B.; JAVORNIK, B. Gynogenic lines of onion (*Allium cepa* L.): evidence of their homozygosity. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 91, n. 4, p. 598-602, 1995.
- CANÇADO, Geraldo Magela De Almeida et al., Avaliação de nove linhagens de milho em cruzamentos dialélicos quanto à tolerância ao alumínio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 37, n. 4, p. 471-478, 2002.

CHENG, Wen-Han et al. Polyamine and its metabolite H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> play a key role in the conversion of embryogenic callus into somatic embryos in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1063, 2015.

CHIANCONE, Benedetta et al. Early embryo achievement through isolated microspore culture in *Citrus clementina* Hort. ex Tan., cvs. 'Monreal Rosso' and 'Nules'. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 413, 2015.

COSTA, N. D.; LEITE, W. de M. Potencial agrícola do solo para o cultivo da cebola. In: **Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CURSO [SOBRE] MANEJO E CONSERVAÇÃO DO SOLO E DA ÁGUA, 2., 2006, Juazeiro-BA. Palestras... Juazeiro, BA: MAPA; SFA-BA; Embrapa Semi-Árido; Embrapa Solos, 2006.

Costa, Nivaldo Duarte; De Resende, Geraldo Milanez. Cultivo da cebola no Nordeste. Embrapa Semiárido-Sistema de Produção (INFOTECA-E), 2007.

DE ALENCAR, José Adalberto; SANTOS, Carlos Antônio Fernandes; YURI, Jony Eishi. Avaliação de ciclos de seleções recorrentes na cultivar de cebola BRS Alfa São Francisco para tolerância a tripses. In: **Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 51., 2011, Viçosa, MG. Hortaliças: da origem aos desafios da saúde e sustentabilidade: anais... Viçosa, MG: ABH, 2011.

DE ALMEIDA CANÇADO, Geraldo Magela et al. Cultivo de plantas in vitro e suas aplicações. **Informe Agropecuário, Belo Horizonte**, v. 30, n. 253, p. 64-74, 2009.

EBRAHIMI R, ZAMANI Z. Effect of Polyamines on *in vitro* gynogenesis of onion (*Allium cepa* L.). *Am Eurasian J Sustain Agric* 3:71–74. 2009.

ELLIS, David et al. Cryopreservation of 12 *Allium sativum* (garlic) Accessions: a Comparison of Plant Vitrification Solutions (PVS2 and PVS3). **Vitro-Cellular and Developmental Biology–Plants**, p. 11-12, 2005.

EPAGRI. *Sistema de produção para cebola: Santa Catarina* (3a. Revisão). Florianópolis: 2000. 91 p. (Epagri. Sistemas de Produção, 16), 2000.

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.

FEHER, Attila; PASTERNAK, Taras P.; DUDITS, Denes. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 74, n. 3, p. 201- 228, 2003.

FÉREOL, Léonidas et al. 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.

FILGUEIRA, F. A. R. Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. 3ed. Viçosa: UFV, 2008. 421p.

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.

FRANCA, J. G. E.; CANDEIA, J. A. Development of short-day yellow onion for tropical environment of the Brazilian northeast. In: **I International Symposium on Edible Alliaceae 433**. 1994. p. 285-290.

FRITSCH RM; FRIESEN N. Evolution, Domestication, and Taxonomy. In: RABINOWITCH HD; CURRAH L (eds). *Allium Crop Science: Recent Advances*. Wallingford: CAB International. p. 5-30. 2002.

GEOFFRIAU E, KAHANE R, RANCILLAC M. Variation of gynogenesis ability in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica* 94:37–44. 1997.

GOLDMAN, Irwin L.; SCHROECK, Geoffrey; HAVEY, Michael J. History of public onion breeding programs in the United States. **Plant Breeding Reviews**, v. 20, p. 67-103, 2002.

Hortic. bras., v.29, n. 2 (Suplemento - CD ROM), julho 2011 S5739 HANELT P. 1990. Taxonomy, evolution and history. In: RABINOWITCH, H.D.; BREWSTER, J.L. (eds). *Onions and allied crops*. v.1. Boca Raton: CRC Press. p.1-26.

HYDE, Peter T.; EARLE, Elizabeth D.; MUTSCHLER, Martha A. Doubled haploid onion (*Allium cepa* L.) lines and their impact on hybrid performance. **HortScience**, v. 47, n. 12, p. 1690-1695, 2012.

IBRAHIM Ahmed, Mahmood et al. Haploid induction in spring onion (*Allium fistulosum* L.) via gynogenesis. **Biotechnology**, v. 15, n. 1/2, p. 10-16, 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Produção agrícola municipal. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br>. Acesso em 15 de janeiro de 2022.

IPGRI, ECP/GR, AVRDC. Descriptors for *Allium* (*Allium* spp.): International Plant Genetic Resources Institute, Rome, European Cooperative for Crop Genetic Resources Networks,

Asian Vegetable Research and Development Center, 43p. 2001.

JAKŠE, Marijana; BOHANEK, Borut; IHAN, Alojz. Effect of media components on the gynogenic regeneration of onion (*Allium cepa* L.) cultivars and analysis of regenerants. **Plant Cell Reports**, v. 15, n. 12, p. 934-938, 1996.

JIMÉNEZ, Víctor M. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on in vitro somatic embryogenesis. **Plant growth regulation**, v. 47, n. 2, p. 91-110, 2005.

JONES, Henry A.; MANN, Louis K. Onions and their allies. **Soil Science**, v. 98, n. 1, p.68, 1963.

KARAMI, Omid; SAIDI, Abbas. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. **Molecular biology reports**, v. 37, n. 5, p. 2493-2507, 2010.

KENEL, Fernand; EADY, Colin; BRINCH, Sheree. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and regeneration of garlic (*Allium sativum*) immature leaf tissue. **Plant cell reports**, v. 29, n. 3, p. 223-230, 2010.

KERBAUY, G.B. Clonagem de plantas ‘‘*in vitro*’’: uma realidade. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, v.1, n.1, p.30-33, maio 1997.

KEVERS, Claire et al. Somatic embryogenesis of *Panax ginseng* in liquid cultures: a role for polyamines and their metabolic pathways. **Plant growth regulation**, v. 31, n. 3, p. 209-214, 2000.

KHAN, PATAN SHAIK SHA VALLI et al., Doubled haploid production in onion (*Allium cepa* L.): from gynogenesis to chromosome doubling. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, v. 142, n. 1, p. 1-22, 2020.

KHOSA, Jiffinvir S. et al. Doubled haploid ‘CUDH2107’ as a reference for bulb onion (*Allium cepa* L.) research: development of a transcriptome catalogue and identification of transcripts associated with male fertility. **PLoS one**, v. 11, n. 11, p. e0166568, 2016.

KHOSA, Jiffinvir S. et al. Enhancing onion breeding using molecular tools. **Plant Breeding**, v. 135, n. 1, p. 9-20, 2016.

KIKUCHI, Akira et al. Abscisic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. **Planta**, v. 223, n. 4, p. 637-645, 2006.

KISHOR, Saurabh et al. Effect of spacing and different cultivars on gridgeth and yield of onion

(*Allium cepa* L.) under Lucknow conditions. **Int. J. Pure Appl. Biosci**, v. 5, n. 4, p. 612-616, 2017.

KNUDSON, Lewis. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. **Botanical gazette**, v. 73, n. 1, p. 1-25, 1922.

KRIKORIAN, A.D.; BERQUAM, D.L. Plant cell and tissue culture: the role of Harbe- landt. *The Botanical Review*, New York, v.35, n.2, p.59-88, 1969.

KUMAR, A. et al. Seasonal incidence of major insect pests of onion in relation to biotic and abiotic factors. **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences**, v. 6, n. 1, p. 201-205, 2017.

LAGO DE SOBRADINHO. Petrolina. Palestras... Petrolina: Embrapa Semiárido, 2014. FEHÉR, Attila. Plant Somatic Embryogenesis: Some Useful Considerations. *Biochimica et Biophysica Acta*, pag. 385-402, 2015.

LEITE, Daniela Lopes et al. Melhoramento genético de cebola para as condições tropicais e subtropicais do Brasil. *Revista Colombiana de Ciências Horticolas*, Bogotá, v. 3, n. 1, p.18-27, 2009.

MARCUZZO, Leandro Luiz; KOTKOSKI, Bruna. Caracterização da epidemiologia temporal e espacial da queima das pontas das folhas da cebola. **Summa Phytopathologica**, v. 46, p. 167-170, 2020.

MARTINEZ, Liliana E. et al. Improvement of in vitro gynogenesis induction in onion (*Allium cepa* L.) using polyamines. **Plant Science**, v. 156, n. 2, p. 221-226, 2000.

MATHAPATI, Gururaj Basaya et al. Influence of culture media and their compositions on haploid induction in Indian short day onion. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 89, n. 2, p. 739-746, 2019.

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

NIC-CAN, Geovanny I.; LOYOLA-VARGAS, Víctor M. The role of the auxins during somatic embryogenesis. In: **Somatic embryogenesis: fundamental aspects and applications**. Springer, Cham, 2016. p. 171-182.

OLIVEIRA VR; BOITEUX LS. Cultivo da Cebola. Brasília, DF: **Embrapa Hortaliças**. (Sistema de Produção). 2004.

PONCE, M.; MARTINEZ, Liliana; GALMARINI, C. Influence of CCC, putrescine and gellam gum concentration on gynogenic embryo induction in *Allium cepa*. **Biologia plantarum**, v. 50, n. 3, p. 425-428, 2006.

REIS, Effect; BATISTA, M. T.; CANHOTO, J. M. Effect and analysis of phenolic compounds during somatic embryogenesis induction in *Feijoa sellowiana* Berg. **Protoplasma**, v. 232, n. 3, p. 193-202, 2008.

SACCHET, A. M. O. F. Variabilidade genética: ponto de partida para o melhoramento de plantas. In: SACCHET, A. M. O. F. (Org.). *Genética para que te quero?* Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1999. p. 99-104.

SALGADO, Fernanda Ferreira; DA SILVA SOUZA, Emanuelle Taís; CARNEIRO, Andréa Almeida. EMBRIOGENESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO EM CULTURA DE TECIDOS DE LINHAGENS DE MILHO TROPICAL. **Revista Brasileira de Ciências da Vida**, v. 5, n. 1, 2017.

SEGUI SAMARRO, JM. Reproductive biology and plant biotechnology. (Valencia, Spain: Editorial Polytechnic University of Valencia). 2010a.

SEGUI-SIMARRO JM. Editorial: doubled haploidy in model and recalcitrant species. *Front Plant Sci* 6:1175. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01175>, 2015.

SEGUI-SIMARRO, JM. Androgenesis revisited. *Robot. Rev.* 76, 377-404. 2010b.

SEGUÍ-SIMARRO, José M.; NUEZ, Fernando. How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. **Physiologia Plantarum**, v. 134, n. 1, p. 1-12, 2008.

SOLÓRZANO-CASCANTE, Paúl; SÁNCHEZ-CHIANG, Neiva; JIMÉNEZ, Víctor M. Explant type, culture system, 6-benzyladenine, meta-topolin and encapsulation affect indirect somatic embryogenesis and regeneration in *Carica papaya* L. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1769, 2018.

TAKEDA, Toshiya et al. Effects of exogenous polyamines on embryogenic carrot cells. **Biochemical engineering journal**, v. 12, n. 1, p. 21-28, 2002.

TAN, YanPing et al. Polyamine plays a role in subculture growth of in vitro callus of indica rice. **Acta Biologica Cracoviensia s. Botanica**, v. 59, n. 1, 2017.

TIBURCIO, Antonio F. et al. The roles of polyamines during the lifespan of plants: from development to stress. **Planta**, v. 240, n. 1, p. 1-18, 2014.

VALENCIO AGRB; OLIVEIRA VR; LOPES JF; BOITEUX LS; FONSECA MEN. Estabelecimento de um banco de caracteres botânicos e agronômicos de populações de cebola suaves/doces. **Horticultura Brasileira**, Brasília 22. Suplemento. CD-ROM. 2004.

VAVILOV, N.I. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. In: *Onion And Their Allies: Botany, Cultivation and Utilization*. (eds.). Leonard Hill Books. London, 1963. 286p.

VIEIRA, Renato Luis et al. Morfogênese de plantas de alho in vitro: papel dos reguladores de crescimento na indução e desenvolvimento de bulbos. **Ciência Rural**, v. 44, p. 439- 445, 2014.

WEDZONY, M., FORSTER, BP, ZUR, I., GOLEMIEC, E., SZECHYNSKA-HEBDA, M., DUBAS, E. ovário não polinizado de *Nicotiana tabacum* cultivado in vitro. *Acta Bot.Sem. 23. Theor Appl Genet* **63**, 97-104.

WENDELBO, P. Alliaceae. In: RECHINGER, K.H., (Eds.). *Flora Iranica*. Austria:Graz, p.76-100, 1971.

YARALI F, YANMAZ R (2017) The effects of plant growth regulators on *in vitro* gynogenic embryo formation in onion (*Allium cepa* L.). *Afr J Biotechnol* 16:1977–1983.

YARALI, Faika; RUHSAR, Yanmaz. 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.

Yuri, Jony Eishi; Costa, Nivaldo Duarte; De Resende, Geraldo Milanez. Características produtivas de cultivares de cebola no Submédio do Vale do São Francisco. Embrapa Semiárido-Artigo em periódico indexado (ALICE), 2019.

### **CAPÍTULO III: Uso de diferentes meios de cultura na indução in vitro de cebola**

#### **RESUMO**

O sucesso do sistema de micropropagação agrega um conjunto de fatores sendo eles nutricionais, ambientais e endógenos. No caso específico dos fatores nutricionais as formulações de meios básicos têm sido utilizadas para a indução e micropropagação de plantas no melhoramento genético pois a composição do meio de cultura é relevante para o desenvolvimento da planta, geralmente é constituído por macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, sacarose e agente gelificante os quais visam contribuir para o conhecimento da influência do meio de cultura em resposta in vitro de várias culturas sendo uma delas a cebola (*Allium cepa* L.) o presente trabalho tem como objetivo estudar a resposta embriogênica de ovários de cebolas em meios de cultivo. Vinte botões florais da variedade IPA 11, foram colocados em placas de petri contendo os meios de indução B5, BDS e MS, suplementados com 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2,4 D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, todos os meios tiveram o pH ajustado para 5,8 antes da adição de 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar, em seguida, autoclavado por 15 minutos a 121°C. As placas inoculadas foram levadas para a sala de crescimento com iluminação de (16/8h) a 25°C por um período de 120 dias até a produção do embrião e calos. Foram avaliados; formação de brotos, número de embriões, número de calos, calos friáveis, calos oxidados botões viáveis (BV) e botões vitrificados (BV). Os dados foram submetidos à análise de variância e a comparação entre as médias pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade. O meio BDS proporcionou maior percentual de embriões e menor taxa de formação e oxidação dos calos, enquanto os meios MS e B5 apresentaram maior taxa de calos oxidados e menor número de embriões.

**Palavras-chave:** *Allium cepa*; ginogênese; micropropagação.

**Use of different culture media in the in vitro induction of onion**

## ABSTRACT

The success of the micropropagation system adds a set of factors, including nutritional, environmental and endogenous factors. In the specific case of enutritional factors, the formulations of basic media have been used for the induction and micropropagation of plants in genetic improvement, since the composition of the culture medium is relevant for the development of the plant, generally consisting of macronutrients, micronutrients, vitamins, amino acids, sucrose and gelling agent, which aim to contribute to the knowledge of the influence of the culture medium on the in vitro response of several cultures, one of which is onion (*Allium cepa* L.). The present work aims to study the embryogenic response of onion ovaries in culture media. Twenty flower buds of the IPA11 variety were placed in petri dishes containing B5, BDS and MS induction media, supplemented with 2.0 mg.L<sup>-1</sup> of 2,4 D and 2.0 mg.L<sup>-1</sup> of BAP, all media had the pH adjusted to 5.8 before the addition of 7 g.L<sup>-1</sup> of agar, then autoclaved for 15 minutes at 121°C. The inoculated plates were taken to the growth room with lighting (16/8h) at 25°C for a period of 120 days until the production of the embryo and callus. Were evaluated; bud formation, number of embryos, number of calluses, friable callus, oxidized callus, viable buds (BV) and vitrified buds (BV). Data were subjected to analysis of variance and comparison between means by the Scott knot test at 1% probability. The BDS medium provided a higher percentage of embryos and a lower rate of callus formation and oxidation, while the MS and B5 medium showed a higher rate of oxidized calluses and a lower number of embryos.

**Keywords:** *Allium cepa*; gynogenesis; micropropagation.

## 1 INTRODUÇÃO

As hortaliças são ricas em vitaminas e elementos minerais, muitas apresentam alto valor dietético, as quais constituem um dos alimentos imprescindíveis à nutrição humana. A cebola (*Allium cepa* L.) destaca-se entre as hortaliças, por ser um vegetal muito utilizado na culinária mundial tanto *in natura* como em conserva. É uma planta de estações quentes, apresentam variedades de ciclos tardios e variedades precoce, que produz bem quando recebe tratamentos culturais adequados (MELO et al., 2022).

A micropropagação surge como uma alternativa tanto para a multiplicação dos genótipos de interesse, quanto para a conservação de recursos genéticos (FLÔRES et al., 2011; SILVA et al., 2019; SILVA et al 2020). Essa técnica da cultura de tecidos permite obter, simultaneamente, progressos no melhoramento de plantas por meio da propagação vegetativa, com uma menor incidência de doenças e independente do clima e da época do ano (FERMINO JÚNIOR & SCHERWINSKI-PEREIRA, 2012; OLIVEIRA et al., 2013; SILVA et al., 2021), bem como a conservação de recursos genéticos, pela germinação *invitro*.

As modificações dos componentes do meio de cultura podem afetar, significativamente, a indução de tecido embriogênico, principalmente, em explantes maduros. A escolha do meio de cultura para a indução de ginogênese em cebola ainda vem sendo estudada, pois cada tipo de tecido tem uma necessidade nutricional específica. O meio basal mais amplamente utilizado é o BDS (DUNSTAN & SHORT, 1977) e, em menor grau, o B5 (GAMBORG et al., 1968) e MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962). Com base em que vários aminoácidos, vitaminas e inositol estimulam partenogênese (MUKHAMBETZHANOV, 1997).

O meio MS é universalmente usado, especialmente para morfogênese, cultura de meristemas e regeneração de plantas, é caracterizado devido sua elevada concentração de sais minerais. Já o meio B5 idealizado por Gamborg et al. (1968) é conhecido devido a sua baixa concentração de sais minerais, o que aparentemente é mais preferido por algumas células de determinada espécie.

Quanto ao meio BDS, foi um meio desenvolvido a partir do meio basal B5, onde o que difere é a concentração de sais utilizada para indução de embriões ginogênicos sendo um equilíbrio entre os meios MS e o B5, trabalhos mostram a sua eficiência na indução de embriões em *Allium cepa* L. (JAKSE & BOHANEK, 2003).

A composição do meio de cultura é relevante para o desenvolvimento da planta,

geralmente constituído por macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, sacarose e agente gelificante. Vários meios de cultura têm sido testados e o fator que mais varia entre eles é a concentração de sais minerais (MOREIRA et al., 2012).

Visando contribuir para o conhecimento da influência do meio de cultura na resposta ginogenética da cebola (*Allium cepa* L.), o presente trabalho objetivou estudar a resposta embriogênica de ovários de cebolas em diferentes meios de cultivo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal localizado no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Areia-PB.

### 2.2 Material vegetal

Para a realização deste estudo utilizou-se inflorescências de cebola (*Allium cepa* L.) visando a indução de embriões ginogênicos, onde os bulbos de cebola foram fornecidos por agricultores do Município de Boqueirão bulbos sementes da variedade (IPA11).

Foram vernalizados por um período de três meses, sob temperatura 9–13°C após o processo de vernalização, foram plantados em casa de vegetação no laboratório de biotecnologia, a cultura passou pelos tratamentos culturais e adubação exigida. Ao emitirem as inflorescências coletou-se botões florais imaturos, próximo da antese medindo de 3-5 mm.

### 2.3 Desinfestação do material vegetal

Em uma câmara de fluxo laminar os botões florais foram removidos das umbelas e esterilizados com álcool 70% por 1 minuto, em seguida, colocados em uma solução de hipoclorito de sódio a 5% (NaClO) com três gotas de twen 20 por 15 minutos e enxaguados quatro vezes com água destilada estéril.

### 2.4 Inoculação e caracterização

Após a desinfestação, vinte botões florais foram colocados em placas de petri (90mm x 15mm) contendo os meios de indução B5, BDS e MS (Tabela 1), suplementados com 2,0mg.L<sup>-1</sup> de 2,4 D e 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, todos os meios tiveram o pH ajustado para 5,8

antes da adição de 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar, em seguida, autoclavado por 15 minutos a 121°C. As placas inoculadas foram levadas para a sala de crescimento com iluminação de (16/8h) a 25°C por um período de 120 dias até a produção do embrião e calos então após esse período foi feita a transferência para um meio de regeneração MS ½ de força e foram realizadas as caracterizações, avaliando características número de bulbos (NB), número de embriões (NEM), número de calo (NC), número de calos friáveis (NCF), número de calos oxidados (NCOX), número de botões viáveis (NBV), botões vitrificados (QBV), porcentagem de calos obtidos por tratamento (% de calos) e porcentagem de embriões obtidos por tratamento (%ET).

**Tabela 1.** Composição básica dos principais meios de cultura utilizados para indução de embriões ginogenéticos em *Allium cepa* L.

Componentes	B5	MS	BDS
mg L <sup>-1</sup>			
<b>Macronutrientes</b>			
CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	150,00	440,0	150,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	170,0	
KNO <sub>3</sub>	2500,00	1900,0	253,00
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	
MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	250,0	370,0	247,00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ,H <sub>2</sub> O	150,0	-	172,00
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	1650,0	320,16
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	230,06
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134,00	-	134,00
<b>Micronutrientes</b>			
CoCl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	0,25	0,025	0,025
CuSO <sub>4</sub> , 5 H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,039
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,0	6,2	3,0
KI	0,75	0,83	0,75
MnSO <sub>4</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	13,2	22,3	13,2
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ,2 H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25
ZnSO <sub>4</sub> ,7 H <sub>2</sub> O	2,0	8,6	2,0
Fe(SO <sub>4</sub> ) , 7 H <sub>2</sub> O	27,8**	27,8	27,85
Na <sub>2</sub> EDTA , 2 H <sub>2</sub> O	37,2*	37,2	37,25
<b>Orgânicos</b>			
Ácido nicotínico	1,0	0,5	1,0
Glicina	-	2,0	-
Mio-inositol	100**	100	100**
Piridoxina.hcl	1,0***	0,5	1,0***
Tiamina.hcl	10,0***	0,1	10,0***
pH	5,8	5,7	6,0

## 2.5 Análise estatística

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com três tratamentos, sendo os meios de cultivo (MS, BDS e B5) com 10 repetições, cada placa tinha 20 botões florais. Para as análises estatísticas utilizou-se o programa computacional R studio, onde os dados número de bulbos (NB), número de embriões (NEM), número de calo (NC), número de calos friáveis (NCF), número de calos oxidados (NCOX), número de botões viáveis (NBV), botões vitrificados (QBV), porcentagem de calos obtidos por tratamento (% de calos) e porcentagem de embriões obtidos por tratamento (%ET). Foram submetidos à análise de variância e posterior comparação entre as médias pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O meio BDS foi o primeiro meio que apresentou botões com estruturas diferentes do habitual descrito na literatura que seria a formação de embriões e ou calos, pois além desse processo de formação, também se observou botões oxidados e vitrificados em algumas placas, que é considerado normal pois esses processos que culminam em um embrião passam por diversos processos, podendo incluir surgimento de anomalias durante as etapas de transição do embrião até a aclimação. A histodiferenciação é um dos principais pontos na geração de embriões, fazendo com que os mesmos não sobrevivam as demais etapas da regeneração (RAMAKRISHNAN, et al., 2005).

A indução de calos foi observada em todos os meios de cultivo (MS, BDS e B5), onde pode se observar que ambos os meios inicialmente apresentam o mesmo desenvolvimento inicial intumescimento do botão ((Fig. 1A, 1B e 1C). Os botões florais seguiram as etapas de desenvolvimento apresentando, coloração verde escura e verde mais clara, e formação de calos friáveis para todos os meios (Fig. 1D, 1E e 1F). Os vários tipos de respostas morfogênicas *in vitro* apresentadas nesse estudo fazem com que seja necessário o estabelecimento de condições padronizadas de cultivo o genótipo. A escolha adequada do meio nutritivo e a padronização das condições de cultivo constituem etapas relevantes no processo de estabelecimento *in vitro* da cultura. A composição do meio decultura e os fatores ambientais podem resultar na intensificação das respostas

morfogênicas, bem como em maior número de explantes responsivos (BRAVO et al., 2018).

Em placas que continham o meio BDS observou-se o desenvolvimento de estruturas calogênicas culminando para a indução de embrião com formação de sementes (Figura.1G e1H). Os calos são descritos como sendo manifestações do estado celular de desdiferenciação (FEHÉR, 2015), ou ainda, podem ser oriundos de células que envolvem, geralmente, tecidos vasculares de diferentes órgãos da planta (YANG et al., 2010; SUGIMOTO; GORDON; MEYEROWITZ, 2011). Sem etapa prévia de desdiferenciação, salienta-se que após a iniciação da embriogênese somática, o processo se torna auto regulatório e pode prover os sucessivos estádios da via embriogênica sem ou com contribuição ínfima de sinais externos, requerendo atividades simultâneas de sinalização e vias genéticas (SMERTENKO; BOZHKOV, 2014).

O desenvolvimento do botão floral no meio MS não evoluiu de etapas em sua maioria ele segue branco classificado como inviável devido seu aspecto de seco dentro da placa, (Fig.1I) enquanto para o meio B5 teve-se a formação de calos que advindo de botões secos e branco com aparência de morto (Fig.1J).

O meio MS teve uma maior formação de calos oxidados e vitrificados (Fig. 1L), o processo de vitrificação é uma das principais anomalias que tem recebido atenção especial nos últimos anos, tendo sido observada a interação simultânea de diversos fatores, interferindo nas principais vias metabólicas como fotossíntese, respiração e transpiração (BATALHA et al., 2022).

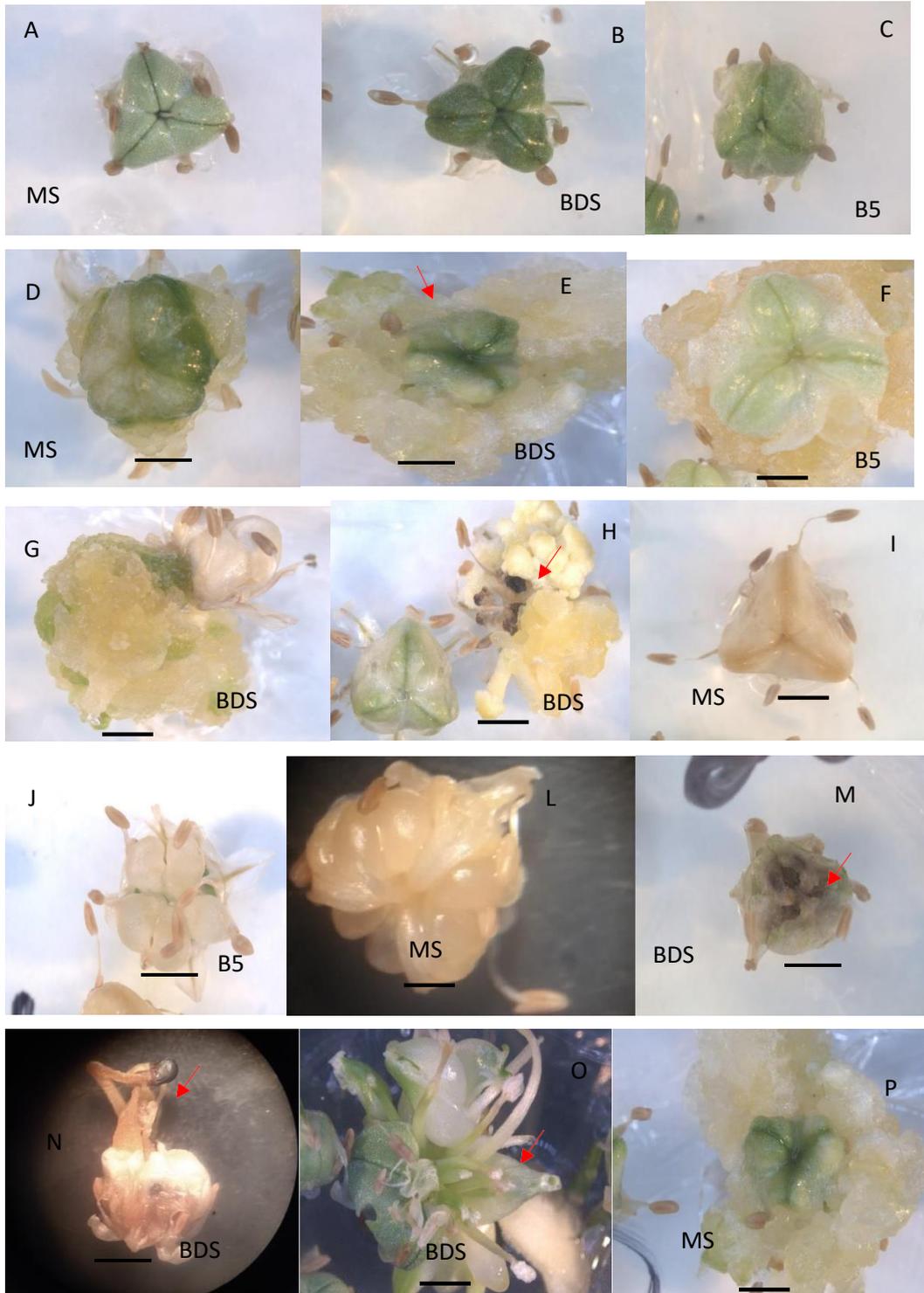
De acordo com Almeida et al. (2020), entende que normalmente observa-se que os explantes apresentem altos níveis de oxidação, a partir de 90 dias de cultivo corroborando com esse estudo, que observou a formação de calos e botões vitrificados, durante ou após um evento de oxidação do explante. Não sendo desejável esse tipo de evento no cultivo *in vitro*. Segundo Sugimoto et al., (2011), para que ocorra o processo de regeneração de plantas a partir de calos, as células devem operar como gatilho inicial da regeneração celular em plantas. Provavelmente, neste estudo, podemos dizer que o gatilho para a diferenciação celular não foi acionado, seja ele pela ativação dos genes responsáveis pela diferenciação celular ou pela falta de células competentes para dar início ao processo.

O meio BSD teve a maior formação de embriões ginogênicos, porém, estes foram observados já no final das avaliações com auxílio de uma lupa microscópica de (40X) (Fig.1

N). Os calos que evoluíram para embriões no meio BDS eram calos friáveis e advinham de botões classificados como viáveis, porém esses ao serem repicados para o meio de regeneração (MS ½), meio padrão de regeneração que eram transferidos aos 30 dias (fig.10), as respostas de indução são dependentes do material genético, sendo influenciadas pela composição do meio de cultura (OLIVEIRA et al., 2013). Sendo, portanto, a resposta da variação de resultados entre os meios de cultivo estudados.

O meio MS, apresentou maiores porcentagens de botões com calos (27%), em relação aos demais tratamentos avaliados, porém teve uma baixa indução de embriões ginogênicos (2%) de todo o material inoculado para esse meio quando comparado com o meio BSD (Tabela 2.) A manutenção do crescimento contínuo dos calos *in vitro* é assegurada através da transferência periódica, sob condições assépticas, de pequenas porções de tecido para novos meios de cultura (PARANHOS, 2014). Este procedimento, vulgarmente denominado repicagem, é necessário porque a contínua proliferação do calo torna o meio de cultura progressivamente mais desidratado e mais pobre em nutrientes, ao mesmo tempo em que se verifica uma acumulação de produtos do metabolismo celular que podem atingir níveis tóxicos.

O meio de cultura que apresentou menor desempenho foi o meio B5, onde observou-se maior formação de calo e menor formação de embriões o qual não chega a 1% de todo material inoculado para esse tratamento, o que pode ser explicado pelas concentrações de sais que não foram eficientes na indução de embriões nem para a formação de calos. De acordo com Srivastava e Chaturverdi (2008) a indução de calos e a regeneração de plantas depende totalmente do genótipo estudado, sendo, portanto, poucas espécies de cebolas que tem sido estudada a indução de calos. Segundo Su e Zhang (2014), três fases podem ser reconhecidas na regeneração de plantas a partir de calos. Na primeira, células somáticas provenientes dos tecidos dos explantes respondem a sinais hormonais e, dessa forma, se comportam como células meristemáticas em um processo conhecido como dediferenciação. Na segunda fase, as células competentes dos calos são reprogramadas para a formação específica de determinado órgão, de acordo com o balanço hormonal. A terceira fase, a morfogênese, é dependente de hormônios exógenos suplementares, que, portanto, têm ação direta nas primeiras fases da regeneração *in vitro*.



**Figura 1.** Processo de indução de calos e embriões em três meios de cultura diferentes (MS, BDS e B5) em cebola da variedade IPA 11, *Allium cepa* L. Barra = 1cm. (RODDRIGUES, C.A.P.S).

**Tabela 2.** Porcentagem de calos e embriões ginogênicos de *Allium cepa* L. induzidos *in vitro* a partir de diferentes meios de cultivo *in vitro* para a variedades IPA 11.

Variedade IPA 11		
Tratamentos	% Calos	% Embriões
Meio BSD	9	6,5
Meio MS	27	2
Meio B5	9,5	0,5

Observou diferença significativa apenas para a variável quantidade de botões vitrificados, onde observou diferença significativa a nível de 1% de probabilidade pelo teste F (Tabela 3), mesmo utilizando diferentes meios com as mesmas concentrações de reguladores de crescimento não foi possível obter uma resposta significativa que atendesse às condições básicas para a indução de embriões ginogênicos, em nenhum dos tratamentos (meios de cultura).

Estudos envolvendo a embriogênese somática e a regeneração em plantas de amora, envolvendo estudos com diferentes meios de cultura e diferentes compostos, obtiveram uma boa formação e desenvolvimento de embriões com a adição de 700 mg. L<sup>-1</sup> de extrato de malte ao meio de cultivo, o que pode nos ajudar nessa pesquisa para poder explicar o insucesso da não indução de embrião ou até mesmo a regeneração de plantas (SANTOS et al., 2021; SABOONI & SHEKAFANDEH, 2017).

**Tabela 3.** Resumo da análise de variância (quadrados médios) da influência de três protocolos na regeneração *in vitro* de embriões ginogênicos de *A. cepa* L, Variedade IPA11.

FV	QM							
	GL	NB	NEM	NC	NCF	NCO	NB	QBV
TRAT	2	0.03 <sup>ns</sup>	3.90 <sup>ns</sup>	42.03 <sup>ns</sup>	26.23 <sup>ns</sup>	0.40 <sup>ns</sup>	7.60 <sup>ns</sup>	361.30 <sup>**</sup>
RESÍDUO	27	0.06	1.90	14.25	8.55	0.37	3.65	39.86
TOTAL	29	1.86	59.20	468.97	283.36	10.80	114.00	1798.70

Número de bulbos (NB), número de embriões (NEM), número de calo (NC), número de calos friáveis (NCF), número de calos oxidados (NCOX), número de botões viáveis (NBV), botões vitrificados (QBV).

De acordo com o teste de media Scott knott a 1% de probabilidade pode-se observar que apenas a variável quantidade de botões vitrificados apresentou diferença significativa, a vitrificação é um problema sério na cultura de tecidos de plantas (ZIV, 1991; DEBERGH et al., 1992) produzindo a partir de estresses ligados a vários fatores como alta umidade, alto nível de reguladores de crescimento, acúmulo de gás (KEVERS et al., 2004). Outra provável resposta para a vitrificação deve-se ao uso de recipientes de cultura pequenos, pois a aeração no recipiente diminuiu e bem como a solidificação do meio que contem ágar o que pode ter resultado na produção de alta umidade no recipiente de cultura, aumento da absorção de água pelas células (JAN et al., 2021).

Os brotos hiperhídricos formados neste estudo eram vítreos e translúcidos, sem crescimento e de tamanho muito pequeno, sintomas semelhantes descritos por Kevers et al., (2004). O problema da vitrificação na micropropagação também foi relatado por Lebedev et al., (2018), Kadota e Niimi (2003), Ivanova et al., (2006). Segundo Fontes et al., (1999), esse resultado é devido as altas concentrações endógenas de auxinas e citocininas no tecido inoculado, a alta concentração de reguladores de crescimento causa acúmulo de etileno nos vasos cultivados que levando à hiperhidricidade no cultivo *in vitro* (ŽD'ÁRSKÁ et al., 2013).

Resultados encontrados quanto a vitrificação em *Allium*, foi observado por Liu et al., (2017) onde eles observaram 94,17% de vitrificação em meios suplementados com reguladores a vitrificação pode se ocorrer além da suplementação com reguladores de crescimento como também pode ser devido a fonte de nitrogênio que é utilizada (JAN et al., 2021).

**Tabela 4.** Teste de médias para a influência de três protocolos na regeneração *in vitro* de embriões ginogênicos de *A. cepa* L, Variedade IPA 11.

Meio	IPA 11
	QBVD
BDS	5,8b
MS	7,1b
B5	16,8 <sup>a</sup>

Botões vitrificados (QBVD). Médias seguidas com mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

#### 4 CONCLUSÃO

De acordo com o estudo a respeito do uso de meio de cultivo na indução de embriões em cebola é possível concluir que a indução é afetada significativamente pelo meio que é utilizado para a propagação *in vitro*. Quando é considerado o conjunto das variáveis; número de bulbos, número de embriões, número de calo, número de calos friáveis, número de calos oxidados, número de botões viáveis, quantidade de botões vitrificados é indicado utilizar o meio BDS, pois esse meio foi o que apresentou melhores resultados quanto a indução de embriões.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Raphael Ferreira et al. Capacity for somatic embryogenesis of adult oilpalm genitors (*Elaeis guineensis*, var. *Pisifera*) from immature leaf tissues. **South African Journal of Botany**, v. 131, p. 229-239, 2020.
- BORÉM, A. Melhoria de Plantas. 3ª.ed., Viçosa: **Universidade Federal de Viçosa**, 2001. 500 p.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S.; REGAZZI, A. J. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. rev. e ampl. **Viçosa: Ed. da UFV**, v. 2, 2014.
- DEBERGH, Pierre et al. Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. **Plant cell, Tissue and organ culture**, v. 30, n. 2, p. 135-140, 1992.
- FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, v. 1, 1998.
- FERREIRA-MOURA, Islaine; DONINI, Lorena Pastorini; CÔRREA, Maria Goreti. INFLUÊNCIA DE FONTES DE CARBONO NA GINOGÊNESE in vitro DE PEPINO (*Cucumis sativus* L.) Autor (es).
- FONTES, M. A. et al. Hyperhydricity in pepper plants regenerated in vitro: involvement of BiP (binding protein) and ultrastructural aspects. **Plant cell reports**, v. 19, n. 1, p. 81-87, 1999.
- IVANOVA, Mariyana et al. Endogenous cytokinins in shoots of *Aloe polyphylla* cultured in vitro in relation to hyperhydricity, exogenous cytokinins and gelling agents. **Plant Growth Regulation**, v. 50, n. 2, p. 219-230, 2006.
- IVANOVA, Mariyana et al. Endogenous cytokinins in shoots of *Aloe polyphylla* cultured in vitro in relation to hyperhydricity, exogenous cytokinins and gelling agents. **Plant Growth Regulation**, v. 50, n. 2, p. 219-230, 2006.
- KADOTA, Masanori; NIIMI, Yoshiji. Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in in vitro pear cultivar shoots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 72, n. 3, p. 261-265, 2003.
- KEVERS, Claire et al. Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 77, n.2, p. 181-191, 2004.
- KURTZ, C.; MENEZES JÚNIOR, F.O.G.; HIGASHIKAWA, F.S. Fertilidade do solo, adubação e nutrição da cultura da cebola. Florianópolis: **Epagri**, 2018. p.104.
- CEBOLA, A. FERTILIDADE DO SOLO, ADUBAÇÃO E NUTRIÇÃO DA CULTURA DA CEBOLA. 2018.
- LEBEDEV, Vadim et al. Effects of growth regulators and gelling agents on ex vitro rooting of

raspberry. **Plants**, v. 8, n. 1, p. 3, 2018.

MEZEI, Snežana; KOVACEV, L.; NAGL, Nevena. Sugar beet micropropagation. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 20, n. 1, p. 9-14, 2006.

DE MELO MASSARANDUBA, Wendel et al. PRODUÇÃO E RENDIMENTO DA CEBOLA SOB DIFERENTES MANEJOS HÍDRICO E NUTRICIONAL. **Revista Caatinga**, v. 35, n. 2, p. 402-411, 2022.

MOREIRA, Rodrigo A. et al., Diferentes meios de cultura no crescimento *in vitro* desorvetão. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 7, n. 3, p. 409-413, 2012.

RAMAKRISHNAN, K. et al. Developmental pattern formation of somatic embryos induced in cell suspension cultures of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. **Plant cellreports**, v. 24, n. 9, p. 501-506, 2005.

DOS SANTOS, Karen Cristina Fialho et al. Potencial regenerativo de calos induzidos em anteras de *Citrus medica* L. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 6, p. 54394-54404, 2021.

SEGUNDO, Vanessa Cláudia Vasconcelos et al. PARÂMETROS GENÉTICOS, DIVERSIDADE GENÉTICA E CORRELAÇÕES EM LINHAGENS DE CEBOLA. **Revista Caatinga**, v. 35, n. 2, p. 352-362, 2022.

SRIVASTAVA, Priyanka; CHATURVEDI, Rakhi. In vitro androgenesis in tree species: an update and prospect for further research. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 5, p. 482-491, 2008.

SU, Ying Hua; ZHANG, Xian Sheng. The hormonal control of regeneration in plants. **Current topics in developmental biology**, v. 108, p. 35-69, 2014.

SUGIMOTO, Kaoru; GORDON, Sean P.; MEYEROWITZ, Elliot M. Regeneration in plants and animals: dedifferentiation, transdifferentiation, or just differentiation?. **Trends in cell biology**, v. 21, n. 4, p. 212-218, 2011.

VILLA, Fabíola Villa et al. Meios de cultura e reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de amoreira-preta. **Scientia agraria**, v. 11, n. 2, p. 109-117, 2010.

ŽD'ÁRSKÁ, Markéta et al. Proteome analysis in *Arabidopsis* reveals shoot- and root-specific targets of cytokinin action and differential regulation of hormonal homeostasis. **Plant Physiology**, v. 161, n. 2, p. 918-930, 2013.