

# MICROPROPAGAÇÃO DE CEBOLA A PARTIR DE BULBINHOS INDUZIDOS *IN VITRO* <sup>(1)</sup>

BENEDITA MARIA RODRIGUES <sup>(2)</sup>, JOSÉ EDUARDO BRASIL P.PINTO <sup>(3,4)</sup>,  
WILSON ROBERTO MALUF <sup>(3,4)</sup> e CLÓVIS MAURÍLIO DE SOUZA <sup>(3)</sup>

## RESUMO

Visando determinar um método para micropropagação a partir de bulbinhos *in vitro*, de cultivares de cebola (*Allium cepa* L.), foram realizados três experimentos, avaliando-se a influência do 6-benzilaminopurina (BAP) x ácido naftalenoacético (ANA) e posição do explante no meio de cultura, a influência de bulbinhos desenvolvidos em diversas concentrações de sacarose e o efeito do diâmetro dos bulbinhos sobre a taxa de multiplicação *in vitro*. Pelos resultados, a posição vertical dos explantes mostrou maior tendência para porcentagem de regeneração nos cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce. O efeito das concentrações de fitorreguladores na porcentagem de regeneração não foi verificado para o 'Pira Ouro', enquanto para o 'Pirana Precoce', porcentagem mais elevada foi obtida em 4,0 mg/L de BAP x 0,5 mg/L de ANA. Maior taxa de multiplicação foi observada para os dois cultivares em BAP (2,0 mg/L) x ANA (0,25 mg/L). Bulbinhos do cultivar Pira Ouro e híbrido entre Pira Ouro e Pirana Precoce, desenvolvidos em 120 g/L de sacarose, mostraram-se mais adequados à micropropagação *in vitro* no material utilizado. Com relação ao diâmetro inicial do explante, o 'Pira Ouro' não mostrou diferença estatística para os parâmetros avaliados, enquanto no 'Pirana Precoce' maior porcentagem de regeneração foi obtida nos diâmetros M (5 a 10 mm) e P (< 5 mm), e maior número de brotos no diâmetro M.

**Termos de indexação:** cebola, *Allium cepa* L., cultura de tecidos, micropropagação.

---

<sup>(1)</sup> Parte da Dissertação de Mestrado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas, apresentada pelo primeiro autor à ESAL, Lavras (MG), em 25/11/1994. Recebido para publicação em 25 de maio de 1995 e aceito em 16 de janeiro de 1996.

<sup>(2)</sup> Seção de Genética, Instituto Agrônomo (IAC), Caixa Postal 28, 13001-970, Campinas (SP).

<sup>(3)</sup> Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG, Caixa Postal 37, 37200-000 Lavras (MG).

<sup>(4)</sup> Com bolsa de pesquisa do CNPq.

## ABSTRACT

### MICROPROPAGATION OF ONION FROM *IN VITRO* INDUCED BULBLET

Series of three different experiments were carried out, in order to study the optimization of the use of bulblets obtained *in vitro*, in the micropropagation of the onion (*Allium cepa* L.). Initially, it was evaluated the effects of the interaction between two dosis of 6-benzylaminopurine (BAP) and naphthaleneacetic acid (NAA), and the position of the explant in the medium, for the cultivars Pira Ouro and Pirana Precoce. For 'Pira Ouro' the phytohormone concentrations did not affect the percentage of regeneration; however, for 'Pirana Precoce', the rates of 4.0 mg/L of BAP and 0.5 mg/L of NAA gave the best results. The highest multiplication rate, measured by the number of shoots obtained, for both cultivars, was observed with 2.0 mg/L of BAP and 0.25 mg/L of NAA. The vertical position of the explant showed a tendency of increasing the percentage of regeneration for the two genotypes. Explants from bulblets obtained with the sucrose concentration of 120 g/L were best fitted for the regeneration process, as showed by the second experiment, carried out with the Pira Ouro cultivar and the hybrid Pira Ouro x Pirana Precoce. The size of the bulblet, measured as its diameter, utilized as the source of the explants was studied in the third one, for the same cultivars utilized in the first experiment. For 'Pira Ouro', there was no influence, both, for the percentage of regeneration and the number of shoots obtained. The small diameter (P: < 5 mm) and the medium one (M: 5 a 10 mm), in the Pirana cultivar, had higher percentage of regeneration; the highest number of shoots was obtained with M diameter.

**Index terms:** onion, *Allium cepa* L., tissues culture, micropropagation.

## 1. INTRODUÇÃO

Utilizando-se das técnicas de cultura de tecidos, a manutenção e multiplicação rápida de plantas macho-estéreis, bem como de outras linhas melhoradas, podem ser altamente vantajosas para um programa de melhoramento genético de cebola.

O processo de multiplicação por um único ciclo através de bulbo adulto tem sido descrito com sucesso por alguns autores, como Hussey (1978) e Fujieda et al. (1979).

A propagação *in vitro* de cebola pode ser obtida pela formação de brotos adventícios a partir de tecido basal de bulbo e, subsequente, desses brotos divididos longitudinalmente. No entanto, existem alguns fatores, como a formação de bulbinho, a dormência das plantas utilizadas como explantes e a diminuição na capacidade de regeneração ou taxa de multiplicação, que limitam o processo de micropropagação (Hussey & Falavigna, 1980).

O uso de fitorreguladores do grupo das auxinas, como ANA, é muito dependente do genótipo uti-

lizado. Hussey & Falavigna (1980), trabalhando com explantes secundários dos cultivares Senshyu, Yellow Express e W3, observaram que 'Senshyu', na ausência de ANA, apresentou maior número de brotos, enquanto a concentração de 2,0 mg/L mostrou efeito inibitório. O 'W3' mostrou efeito contrário a 'Senshyu', ou seja, em 2,0 mg/L apresentou grande número de brotos e, na ausência de ANA, baixo número, mostrando ser altamente dependente desta auxina. Para o cultivar Yellow Express, não se observou o efeito de ANA sobre a regeneração em concentrações que variaram de 0 a 16 mg/L.

Segundo Takayama & Misawa (1980), altas concentrações de sacarose têm induzido dormência em bulbos de *Lilium auratum* formados *in vitro*. Bulbilhos de alho obtidos em meio MS, suplementado com 120 g/L de sacarose e 5 g/L de carvão ativado, foram transferidos com sucesso para o solo, não mostrando, portanto, o efeito de dormência (Mohamed-Yasseen et al., 1994).

Kahane et al. (1992) citam que o sucesso na multiplicação por vários ciclos pode ser obtido mediante plantas regeneradas a partir de explante de

disco basal de bulbos de cebola, seguido da indução de bulbificação *in vitro*, com posterior proliferação de brotações, e assim sucessivamente.

Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito de BAP x ANA na taxa de multiplicação de bulbinhos desenvolvidos em diferentes concentrações de sacarose e o efeito do diâmetro do bulbinho utilizado como explante sobre a resposta morfo-genética obtida *in vitro*.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Efeito de BAP x ANA e posição do explante na micropropagação a partir de bulbinhos obtidos *in vitro*

Bulbinhos das variedades Pira Ouro e Pirana Precoce, obtidos em meio MS (Murashige & Skoog, 1962) contendo 60 g/L de sacarose, 7,0 g/L de ágar, em duas condições de temperatura (25 e 30°C), com, aproximadamente, 90 dias de cultivo, foram seccionados no sentido transversal, 5 mm da base, divididos no sentido longitudinal, destruindo-se o broto principal e obtendo-se dois segmentos, os quais foram utilizados como explantes secundários.

Esses explantes foram inoculados em tubos de ensaio contendo 13,0 ml do meio de cultura MS, modificado pela adição de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O (300 mg/L), sacarose (30 g/L), BAP x ANA nas seguintes combinações em mg/L: 2,0 x 0,25; 2,0 x 0,5; 4,0 x 0,25 e 4,0 x 0,5. O pH do meio foi ajustado para 5,9 após a adição de 7,0 g/L de ágar.

Os tubos contendo o meio de cultura foram vedados com tampas plásticas e esterilizados em autoclave horizontal a 120°C e uma atmosfera de pressão, durante 20 minutos.

Visando determinar a influência da sua posição, os explantes foram colocados na horizontal e na vertical em relação ao meio de cultura. Aos 80 dias de cultivo, avaliaram-se a porcentagem de regeneração e número de brotos por explante. As análises dos resultados foram realizadas pelo teste de contingência.

### 2.2 Micropropagação através de bulbinhos desenvolvidos sob diferentes concentrações de sacarose

Bulbinhos do cultivar Pira Ouro e do híbrido intervarietal entre Pira Ouro e Pirana Precoce (Híbrido-120), obtidos a partir de 180 dias de cultivo *in vitro* e desenvolvidos na presença de quatro concentrações de sacarose (30, 60, 90 e 120 g/L), foram seccionados conforme descrito no item 2.1 e utilizados como explantes. Estes foram inoculados na posição vertical, em tubos contendo, aproximadamente, 13,0 ml do meio MS modificado, já descrito, porém suplementado com BAP (2,0 mg/L) x ANA (0,25 mg/L).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições por tratamento e com parcelas constituídas por quatro explantes, sendo os tratamentos representados por bulbinhos desenvolvidos nas quatro concentrações de sacarose.

Aos 80 dias, avaliaram-se a frequência de regeneração (%) e o número de brotos por explante.

### 2.3 Influência do tamanho do bulbinho na frequência de regeneração *in vitro*

Bulbinhos obtidos aos 120 dias de cultivo *in vitro*, dos cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce, foram classificados de acordo com o seu diâmetro em P (< 5 mm), M (5 a 10 mm) e G (> 10 mm) (Figura 1A) e utilizados para a instalação do experimento. Esses bulbinhos foram avaliados quanto à produção de matéria fresca, seca e número de túnicas. Também foram tomadas amostras dentro de cada diâmetro, para cada cultivar, e realizados cortes histológicos na sua região mediana para verificar o número e o tamanho das células presentes nas túnicas.

A produção de matéria fresca e seca foi obtida por meio de balança eletrônica de precisão. Para a determinação da matéria seca, utilizou-se uma amostra de bulbinhos dentro de cada diâmetro. Desse bulbinhos, retiraram-se segmentos com igual produção de matéria fresca, os quais foram submetidos a uma temperatura de 50°C para a secagem.

Os cortes histológicos foram feitos à mão livre e corados com azul-de-toluidina a 10%. Foram montadas lâminas semipermanentes, sendo as avaliações realizadas através de microscopia ótica com câmara clara.

Os bulbinhos, após seccionados, como descrito no item 2.1, foram utilizados como explantes e inoculados na posição vertical em tubos contendo 13,0 ml do meio MS, previamente autoclavado e suplementado com sacarose (30 g/L), BAP (2,0 mg/L)

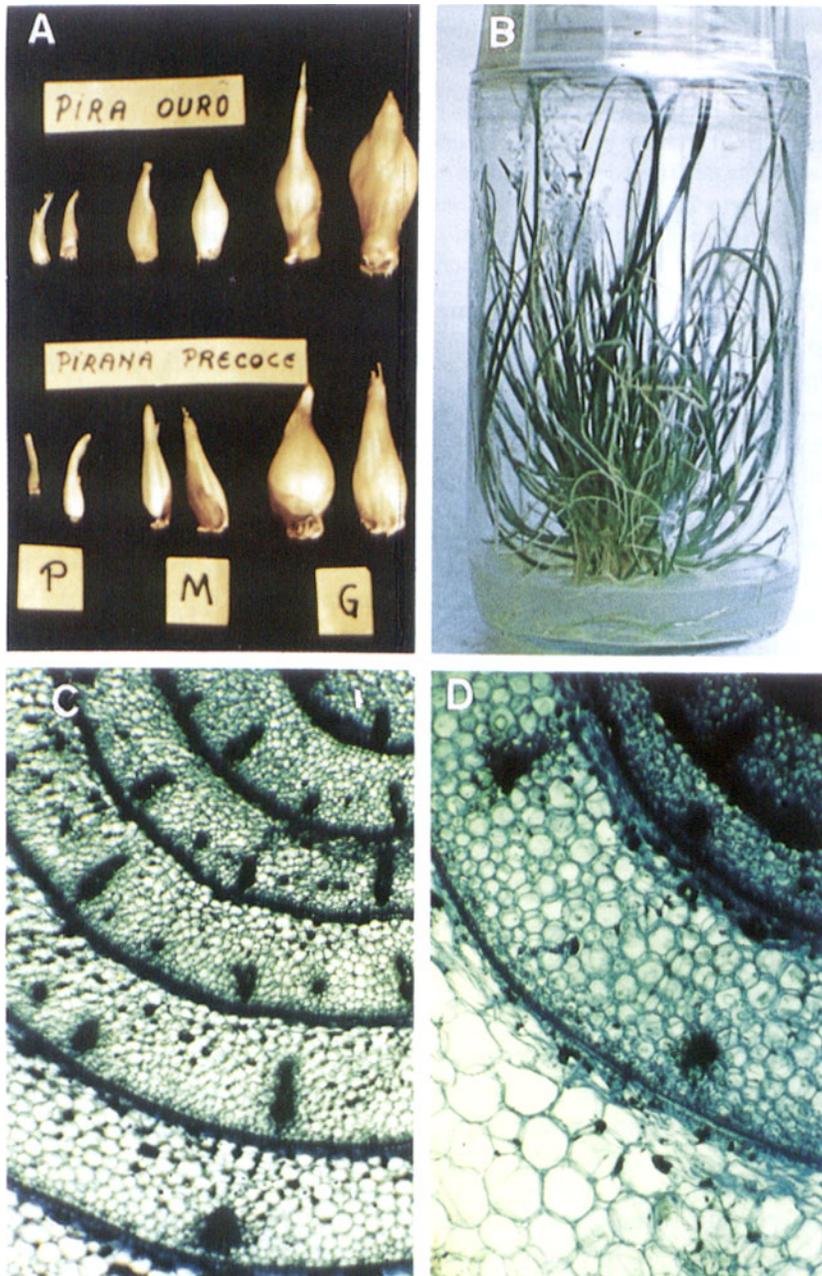


Figura 1. A: Ilustração dos diâmetros P (< 5,0 mm), M (5,0 a 10,0 mm) e G (> 10,0 mm), utilizados como explante; B: Plantas multiplicadas a partir de bulbinhos do cultivar Pirana Precoce; C: Corte histológico de bulbinhos com diâmetro M apresentando 6 túnicas, e D: 4 túnicas.

x ANA (0,25 mg/L) para 'Pira Ouro' e BAP (4,0 mg/L) x ANA (0,5 mg/L) para 'Pirana Precoce'. Após a adição dos fitorreguladores, o pH do meio foi ajustado para 5,9 e, em seguida, solidificado com ágar (7,0 g/L).

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com três tratamentos, correspondendo aos diâmetros dos bulbinhos, quatro repetições e parcelas representadas por oito explantes.

Aos 40 dias, avaliaram-se a frequência de regeneração (%), o número médio de brotos por bulbinho e as correlações entre produção de matéria fresca e seca, o número de túnicas, a frequência de regeneração e o número de brotos por bulbinho de ambos os cultivares.

Todos os experimentos foram mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16/8 horas de luz e escuro (intensidade luminosa de 50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ , utilizando-se lâmpada fluorescente branca fria), e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Efeito de BAP x ANA e posição do explante na micropropagação a partir de bulbinhos obtidos *in vitro*

Os cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce não diferiram estatisticamente para porcentagem de regeneração ( $P < 0,05$ ) pelo teste de  $\chi^2$  realizado através da tabela de contingência (Quadro 1). No entanto, a posição vertical mostrou maior tendência à regeneração, possivelmente devido ao maior contato do tecido basal com o meio de cultura, proporcionando, assim, maior absorção de nutrientes.

O 'Pira Ouro' não mostrou diferença significativa ( $P < 0,05$ ), pelo teste de  $\chi^2$ , para porcentagem de regeneração dentro das combinações de BAP x ANA (Quadro 2). Esses resultados foram semelhantes aos observados por Hussey & Falavigna (1980) para explante primário (bulbo), onde não se verificaram diferenças estatísticas para as doses 0,0 e 0,5 mg/L de ANA e entre as doses 0,5 e 4,0 mg/L de BAP. No 'Pirana Precoce', a porcentagem de regeneração diferiu estatisticamente ( $P < 0,05$ ) pelo

Quadro 1. Porcentagem média de regeneração de plântulas a partir de explantes de bulbinho colocados em duas posições relativas ao meio de cultura

| Cultivar       | Posição  |            |
|----------------|----------|------------|
|                | Vertical | Horizontal |
|                | %        |            |
| Pira Ouro      | 50,0     | 37,5       |
| Pirana Precoce | 61,5     | 46,1       |

Quadro 2. Porcentagem de regeneração de plântulas a partir de explantes de bulbinho inoculados na posição vertical em meio contendo diferentes concentrações de BAP x ANA

| ANA  | BAP (mg/L)  |      |                  |      |
|------|-------------|------|------------------|------|
|      | 'Pira Ouro' |      | 'Pirana Precoce' |      |
|      | 2,0         | 4,0  | 2,0              | 4,0  |
| mg/L | %           |      |                  |      |
| 0,25 | 50,0        | 35,7 | 57,2             | 42,9 |
| 0,50 | 43,8        | 37,5 | 33,4             | 66,7 |

teste de  $\chi^2$  para as doses de BAP x ANA, sendo as maiores porcentagens (57,2 e 66,7) observadas em 2,0 mg/L de BAP x 0,25 mg/L de ANA e 4,0 mg/L de BAP x 0,5 mg/L de ANA respectivamente.

Maior número de brotos por explante secundário foi observado em BAP (2,0 mg/L) x ANA (0,25 mg/L), para os dois cultivares (Quadro 3). No entanto, o 'Pirana Precoce' tem demonstrado maior capacidade de regeneração em relação ao 'Pira Ouro', com uma taxa de multiplicação de 16,8 brotos por bulbinho.

O cultivar Pira Ouro mostrou maior número de brotos na concentração mais baixa de ANA (0,25 mg/L), ao contrário dos resultados verifica-

dos para explante primário, onde maior número de brotos foi observado na dose mais elevada de ANA (1,0 mg/L) (Rodrigues, 1994). Russey & Falavigna (1980) encontraram maior número de brotos na ausência de ANA, tanto a partir de explante primário como de secundário, do cultivar Senshyu.

### 3.2 Micropropagação através de bulbinhos desenvolvidos sob diferentes concentrações de sacarose

Tanto o cultivar Pira Ouro quanto o Híbrido-120 mostraram diferenças nas médias observadas para

porcentagem de regeneração e número médio de brotos por explante, a partir de bulbinhos desenvolvidos sob diferentes concentrações de sacarose.

Para o 'Pira Ouro' (Quadro 4), bulbinhos desenvolvidos em 30 e 60 g/L de sacarose não mostraram respostas morfogenéticas, sendo estas observadas somente em 90 e 120 g/L de sacarose. A maior porcentagem de regeneração (50%) e o maior número de brotos por explante (5,5) ocorreram em bulbinhos desenvolvidos em 120 g/L de sacarose. Quanto ao 'Híbrido-120', apenas bulbinhos desenvolvidos em 30 g/L de sacarose não mos-

Quadro 3. Número médio de brotos regenerados por explante em diferentes concentrações de BAP x ANA - Avaliação aos 80 dias

| ANA  | BAP (mg/L)       |           |                  |           |
|------|------------------|-----------|------------------|-----------|
|      | 'Pira Ouro'      |           | 'Pirana Precoce' |           |
|      | 2,0              | 4,0       | 2,0              | 4,0       |
| mg/L | Número de brotos |           |                  |           |
| 0,25 | 4,8 ± 1,5        | 3,1 ± 1,2 | 8,4 ± 1,7        | 4,3 ± 2,6 |
| 0,50 | 2,6 ± 0,9        | 2,2 ± 0,8 | 1,0 ± 0,6        | 3,7 ± 1,5 |

± = Desvio-padrão da média.

Quadro 4. Frequência de regeneração (%) e número de brotos por explante de bulbinhos do cultivar Pira Ouro e Híbrido-120 desenvolvidos em diferentes concentrações de sacarose, e inoculados na posição vertical em meio MS suplementado com BAP (2,0 mg/L) x ANA (0,25 mg/L) - Avaliação aos 80 dias (<sup>1</sup>)

| Sacarose | 'Pira Ouro'               |                  | 'Híbrido-120'             |                  |
|----------|---------------------------|------------------|---------------------------|------------------|
|          | Frequência de regeneração | Número de brotos | Frequência de regeneração | Número de brotos |
| g/L      | %                         |                  | %                         |                  |
| 30       | 0,1b                      | 0,1b             | 0,1b                      | 0,1b             |
| 60       | 0,1b                      | 0,1b             | 18,6ab                    | 1,6ab            |
| 90       | 41,3a                     | 3,1a             | 32,9a                     | 2,9ab            |
| 120      | 50,0a                     | 5,5a             | 41,3a                     | 4,3a             |

(<sup>1</sup>) Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

traram respostas morfogênicas. A maior porcentagem de regeneração (41,3) e maior número de brotos por explante (4,3) também foram observados em bulbinhos desenvolvidos em 120 g/L de sacarose.

O número médio de brotos por explante secundário, verificado para 'Pira Ouro' e para o 'Híbrido-120' no meio MS suplementado com BAP (2,0 mg/L) x ANA (0,25 mg/L), está próximo ao observado por Kahane et al. (1992) com o clone R-160, obtendo 4,6 brotos por explante em meio MS suplementado com Kin (quinetina) (2,1 mg/L) x ANA (0,9 mg/L) e 5,0 brotos em meio com BAP (1,1 mg/L) x ANA (0,9 mg/L).

Takayama & Misawa (1980) observaram que altas concentrações de sacarose têm causado dormência em bulbinhos de *Lilium* formados *in vitro*. A baixa frequência de regeneração observada em bulbinhos do cultivar Pira Ouro e do Híbrido-120 também pode estar relacionada com uma possível dormência, discordando, portanto, dos resultados de Mohamed-Yasseen et al. (1994), onde bulbinhos de alho formados *in vitro*, quando aclimatados, não apresentaram efeitos de dormência.

Segundo Kahane et al. (1992), a idade da planta-mãe influencia a taxa de regeneração do explante, assim como o tipo e a concentração de reguladores de crescimento afetam o desenvolvimento das plântulas. Um dos fatores que podem ter contribuído

para a baixa frequência de regeneração no Híbrido-120 e em Pira Ouro é a idade dos bulbinhos.

### 3.3 Influência do tamanho do bulbinho na frequência de regeneração *in vitro*

O cultivar Pira Ouro não mostrou diferenças entre as médias das variáveis frequência de regeneração e número médio de brotos por bulbinho, enquanto no 'Pirana Precoce' foram observadas diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

Nesse cultivar (Quadro 5), a frequência de regeneração, considerando-se bulbinhos com diâmetros M e P, foi semelhante, 86,44 e 78,43%, respectivamente, e estes diferiram ( $P < 0,05$ ) do diâmetro G, cuja frequência de regeneração foi relativamente baixa, 33,40%.

Para 'Pira Ouro' (Quadro 6), os resultados sugerem que poderão ser utilizados, na micropropagação, bulbinhos P, M e G. As maiores frequências foram observadas para os diâmetros G e M, com 39,70 e 35,33% de regeneração respectivamente.

Com relação ao número médio de brotos por bulbinho (Quadro 6), o 'Pira Ouro' não mostrou diferença significativa entre as médias, porém o diâmetro G mostrou a maior média, 4,91, enquanto, para o 'Pirana Precoce' (Quadro 5), os diâmetros M e G não diferiram estatisticamente ( $P < 0,05$ ), e a maior média foi de 15,44 brotos por bulbinho, no diâmetro M.

Quadro 5. Matéria fresca, matéria seca, número de túnicas, frequência de regeneração e número de brotos obtidos por bulbinho do cultivar Pirana Precoce (<sup>1</sup>)

| Diâmetro do bulbinho( <sup>2</sup> ) | Matéria fresca | Matéria seca | Número de túnicas | Frequência de regeneração( <sup>3</sup> ) | Número de brotos( <sup>3</sup> ) |
|--------------------------------------|----------------|--------------|-------------------|---|----------------------------------|
|                                      | mg             | mg           |                   | %   |                                  |
| P                                    | 519,60c        | 124,30       | 3,56b             | 78,43a                                    | 4,60b                            |
| M                                    | 820,35b        | 73,40        | 4,88a             | 86,44a                                    | 15,44a                           |
| G                                    | 2.044,90a      | 57,40        | 4,82a             | 33,40b                                    | 8,75ab                           |

(<sup>1</sup>) Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey. (<sup>2</sup>) P: < 5,0 mm; M: 5,0 a 10,0 mm; G: > 10,0 mm. (<sup>3</sup>) Avaliação aos 40 dias.

O cultivar Pira Ouro apresentou maior frequência de regeneração e maior número de brotos por bulbinho no diâmetro G, enquanto o cultivar Pirana Precoce apresentou melhores respostas no diâmetro M (Figura 1B).

Kahane et al. (1992) consideram que o sucesso no processo de multiplicação cíclica depende do diâmetro dos explantes secundários (bulbinhos), os quais devem ser superiores a 10 mm. No presente trabalho, o 'Pirana Precoce' (Quadro 5) não mostrou diferença significativa entre os diâmetros P (< 5 mm) e M (5 a 10 mm), apresentando frequências de regeneração semelhantes e superior ao diâmetro G (> 10 mm), enquanto no 'Pira Ouro' (Quadro 6), as frequências de regeneração observadas para os três diâmetros foram estatisticamente iguais.

Esses dados sugerem que a maior frequência de regeneração e maior número de brotos por bulbinhos estão mais relacionados com o genótipo da planta do que propriamente com o diâmetro do bulbinho utilizado inicialmente no processo de micropropagação.

Os dois cultivares apresentaram comportamentos inversos com relação à frequência de regeneração (Quadros 5 e 6). Esse comportamento pode ser devido a vários fatores, como o período de avaliação (40 dias), influência das diferentes combinações de BAP x ANA utilizadas para cada cultivar, ou até mesmo o genótipo do explante. No entanto,

ambos mostraram maior número de brotos por bulbinho nos diâmetros M e G, embora o 'Pirana Precoce' tenha apresentado um potencial regenerativo superior ao de 'Pira Ouro'.

Análise histológica realizada em amostras de bulbinhos revelou que os dois cultivares apresentaram, dentro dos três diâmetros (P, M e G), número de túnicas variando de 3 a 6, porém com frequências diferentes. No entanto, dentro de um mesmo diâmetro, o tamanho das células estava inversamente relacionado com o número de túnicas, ou seja, quanto maior o número de túnicas, menor o tamanho das células, e quanto menor o número de túnicas, maior o tamanho delas (Figuras 1C e 1D), dentro de um mesmo campo.

Quanto maior o diâmetro do bulbinho, maior foi o tamanho das células presentes nas túnicas mais externas. Esperava-se encontrar maior número de túnicas nos bulbinhos com diâmetros maiores, pois, segundo Kahane et al. (1992), bulbinhos com diâmetro superior a 10 mm foram mais responsivos; no entanto, esses resultados não foram observados.

Os dois cultivares apresentaram o mesmo comportamento para produção de matéria fresca, seca e número de túnicas (Quadros 5 e 6). A maior produção de matéria fresca foi observada no diâmetro G; de matéria seca, no diâmetro P, e o maior número de túnicas nos diâmetros G e M, os quais foram estatisticamente iguais.

Quadro 6. Matéria fresca, matéria seca, número de túnicas, frequência de regeneração e número de brotos obtidos por bulbinho do cultivar Pira Ouro (<sup>1</sup>)

| Diâmetro do bulbinho( <sup>2</sup> ) | Matéria fresca | Matéria seca | Número de túnicas | Frequência de regeneração( <sup>3</sup> ) | Número de brotos( <sup>3</sup> ) |
|--------------------------------------|----------------|--------------|-------------------|---|----------------------------------|
|                                      | mg             | mg           |                   | %   |                                  |
| P                                    | 463,45b        | 158,60       | 2,94b             | 24,98a                                    | 3,53a                            |
| M                                    | 830,00b        | 102,10       | 4,56a             | 35,33a                                    | 4,56a                            |
| G                                    | 2.352,57a      | 75,20        | 5,44a             | 39,70a                                    | 4,91a                            |

(<sup>1</sup>) Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Tukey. (<sup>2</sup>) P: < 5,0 mm; M: 5,0 a 10,0 mm; G: > 10,0 mm. (<sup>3</sup>) Avaliação aos 40 dias.

Os dois cultivares (Quadro 7) apresentaram correlações altas e negativas entre matéria fresca e matéria seca, e entre matéria seca e número de túnicas.

Quadro 7. Correlações entre matéria fresca (M.F.) e seca (M.S.), número de túnica (N.T.), frequência de regeneração (F.R.) e número de brotos (N.B.) por bulbinho, dos cultivares Pira Ouro e Pirana Precoce - Avaliação aos 40 dias

| Variáveis   | Cultivares  |                  |
|-------------|-------------|------------------|
|             | 'Pira Ouro' | 'Pirana Precoce' |
| M.F. - M.S. | -0,858      | -0,809           |
| M.F. - N.T. | 0,866       | 0,627            |
| M.F. - F.R. | -0,998*     | 0,606            |
| M.F. - N.B. | -0,733      | -0,651           |
| M.S. - N.T. | -1,000*     | -0,965           |
| M.S. - F.R. | 0,886       | -0,958           |
| M.S. - N.B. | 0,279       | 0,079            |
| N.T. - F.R. | -0,894      | 1,000*           |
| N.T. - N.B. | -0,295      | 0,184            |
| F.R. - N.B. | 0,692       | 0,210            |

\*: Significativo ao nível de 5%, pelo teste t ( $r > 0,997$ ).

Para as variáveis matéria seca e frequência de regeneração, o 'Pira Ouro' apresentou correlação alta e positiva (0,886), enquanto no Pirana Precoce ela foi alta e negativa (-0,958). Para as variáveis número de túnicas e frequência de regeneração, a correlação foi alta e negativa (-0,894) para Pira Ouro, e alta e positiva (1,000) para Pirana Precoce.

O cultivar Pira Ouro mostrou correlação alta e positiva (0,866) entre produção de matéria fresca e número de túnicas, e alta e negativa (-0,998) entre matéria fresca e frequência de regeneração.

Apesar de os dois cultivares terem apresentado o mesmo comportamento, para algumas variáveis, e altas correlações entre produção de matéria fresca e seca, matéria seca e número de túnicas, estas não deverão ser utilizadas para correlacionar com frequência de regeneração e número de brotos, em material de cebola, pois os cultivares utilizados apresentaram comportamento distinto. Esses resultados sugerem que a capacidade de regeneração *in vitro* de cada material está mais relacionada a fatores morfogênicos do que morfológicos, pois os bulbinhos com as mesmas características morfológicas responderam diferentemente *in vitro*, mostrando ser este fator inerente a cada cultivar, independentemente do diâmetro utilizado.

#### 4. CONCLUSÕES

1. O explante, quando colocado na posição vertical em relação ao meio de cultura, mostrou-se mais responsivo e com maior porcentagem de regeneração.

2. Não se observou o efeito de BAP x ANA na porcentagem de regeneração do cultivar Pira Ouro. No 'Pirana Precoce', as melhores respostas foram para 2,0 mg/L de BAP x 0,25 mg/L de ANA e 4,0 mg/L de BAP x 0,25 mg/L de ANA.

3. Maior taxa de multiplicação foi observada com 2,0 mg/L de BAP x 0,25 mg/L de ANA para ambos os cultivares.

4. Bulbinhos do cultivar Pira Ouro e do 'Híbrido-120', desenvolvidos em 120 g/L de sacarose, mostraram-se mais adequados para a multiplicação de plântulas *in vitro*.

5. No cultivar Pira Ouro, o diâmetro inicial do bulbinho não influenciou a multiplicação *in vitro*, enquanto no 'Pirana Precoce' o diâmetro M apresentou melhores respostas.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FUJIEDA, K.; MATSUOKA, N. & FUJITA, Y. Vegetative multiplication of onion, *Allium cepa* L., through tissue culture. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, Kyoto, **48**(2):459-467, 1979.

- HUSSEY, F. *In vitro* propagation of onion *Allium cepa* by axillary and adventitious shoot proliferation. *Scientia Horticulturae*, Netherlands, **9**:227-236, 1978.
- HUSSEY, F. & FALAVIGNA, F. Origin and production of *in vitro* adventitious shoots in the onion, *Allium cepa* L. *Journal of Experimental Botany*, London, **31**(125):1675-1686, 1980.
- KAHANE, R.; RANCILLAC, M. & DE LA SERVE, B.T. Long-term multiplication of onion (*Allium cepa* L.) by cyclic shoot regeneration *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Netherlands, **28**:281-288, 1992.
- MOHAMED-YASSEEN, Y.; SPLITTSTOESSER, W. & LITZ, R.E. *In vitro* shoot proliferation and production of sets from garlic and shallot. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, **36**:243-247, 1994.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, **15**:473-497, 1962.
- RODRIGUES, B.M. *Micropropagação e bulbificação in vitro de cebola (Allium cepa L.)*. Lavras, 1994. 109p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - ESAL, 1994.
- TAKAYAMA, S. & MISAWA, M. Differentiation in *Lilium* bulb scales grown *in vitro*. Effects of activated charcoal, physiological age of bulbs and sucrose concentration on differential and sucrose concentration on differentiation and scale leaf formation *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, **48**:121-125, 1980.