

AJUSTE DO PROTOCOLO DE BULBIFICAÇÃO *IN VITRO* DE ALHO, CONSIDERANDO ASPECTOS DE CONSISTÊNCIA DO MEIO DE CULTURA, RECIPIENTES DE CULTIVO E NÚMERO DE PLANTAS POR RECIPIENTE

ADJUSTMENT OF THE *IN VITRO* GARLIC BULBIFICATION PROTOCOL, CONSIDERING CONSISTENCY ASPECTS OF THE CULTURE MEDIUM, CULTURE CONTAINERS AND NUMBER OF PLANTS PER CONTAINER

Ernandes Arcanjo da Silva¹, Ludmila Ribeiro de Sousa¹, Christian Viterbo Maximiano², Francisco Vilela Resende³

¹ Alunos do Curso de Agronomia

² Professor Mestre do Curso de Agronomia

³ Pesquisador Embrapa Hortaliças

Resumo

O cultivo *in vitro* de ápices caulinares com objetivo de obter plantas livres de vírus é uma das principais aplicações da cultura de tecidos vegetais para cadeia produtiva de alho. A metodologia em uso proporciona obtenção de até 80% de plantas livres para as espécies de vírus indexadas. O processo de bulbificação ainda necessita de ajustes para aumentar a eficiência de micropropagação do alho *in vitro*. O protocolo engloba desde a fase da regeneração de parte aérea até a bulbificação, sendo esta última bastante sensível e a que mais necessita de aperfeiçoamentos. Nesse sentido, foram avaliadas nesta etapa da formação dos microbulbos *in vitro* algumas modificações relacionadas à consistência do meio de cultura, tipos de recipientes de cultivo e número de plantas por recipiente. Os resultados obtidos para a cultivar Amarante mostram que a bulbificação foi mais eficiente no frasco de vidro tipo aspargo (16x5,5cm), com 25 ml de volume de meio de cultura de consistência sólida e uma planta por recipiente, obtendo-se maior comprimento de plantas, diâmetro e peso de microbulbos. Usando-se 50 ml de meio de cultura por frasco, não há diferença entre 1 ou 2 plantas na formação do microbulbo. Para a cultivar Ito, considerando o peso e diâmetro dos microbulbos, pode-se utilizar com a mesma eficiência na bulbificação, o tubo de ensaio (20x2,3cm) com uma planta por recipiente, tanto com meio líquido quanto sólido ou o frasco de vidro com meio de cultura de consistência líquida, volume de 50 ml e duas plantas por frasco.

PALAVRAS-CHAVE: *Allium sativum* L.; cultivo *in vitro*; meio de cultura; microbulbos.

Abstract

The *in vitro* cultivation of stem apexes in order to obtain virus-free plants is one of the main applications of plant tissue culture for the garlic production chain. The methodology in use provides obtaining up to 80% of free plants for the indexed virus species. The bulbing process still needs adjustments to increase the garlic micropropagation efficiency *in vitro*. The protocol ranges from the shoot regeneration phase to bulbification, the latter being quite sensitive and the one that most needs improvement. In this sense, some modifications related to the consistency of the culture medium, types of culture containers and number of plants per container were evaluated at this stage of *in vitro* microbulb formation. The results obtained for the Amarante cultivar show that bulbing was more efficient in the asparagus-type glass flask (16x5cm) plants, diameter and weight of microbulbs. Using 50 ml of culture medium per flask, there is no difference between 1 or 2 plants in microbulb formation. For the Ito cultivar, considering the weight and diameter of the microbulbs, the test tube (20x2cm). With culture medium of liquid consistency, volume of 50 ml and two plants per flask.

KEYWORDS: *Allium sativum* L.; *in vitro* cultivation; culture medium; microbulbs.

Contato: ludmila.sousa@souicesp.com.br; ernandes.silva@souicesp.com.br; christian.viterbo@icesp.edu.br.

Introdução

Atualmente, o Brasil é responsável por apenas 0,4% da produção mundial de alho (*Allium sativum* L.), sendo o sétimo maior consumidor mundial e o segundo maior importador dessa hortaliça (Gründling, et al. 2021).

O alho (*Allium sativum* L.) pertence à família Alliaceae. É uma planta tenra, que atinge cerca de 50cm de altura, tem folhas alongadas e estreitas, cerosas e com seção em “V”. As bainhas formam um pseudocaule curto, onde a parte inferior é um bulbo que é composto por vários

bulbilhos, popularmente chamados de “dentes” (FILGUEIRA, 2008).

O cultivo *in vitro* permite o crescimento e multiplicação de células, tecidos, órgãos ou partes de órgãos de plantas, dentro de um meio nutritivo (CARVALHO, 1997). De acordo com ROCHA, 2009, citado por SANTOS, 2022 o cultivo *in vitro* é importante por possibilitar uma rápida produção de materiais propagativos livres de pragas e doenças e com qualidade elevada da genética e fitossanidade em um menor tempo. Além de permitir, por meio dessa técnica, ter elevada produção de plantas sem interferências climáticas.

Os protocolos são documentos ou normativas que estabelecem como devem ser feitos procedimentos em laboratórios ou outras áreas. (CONCEITO DE, 2021). Os protocolos são importantes para direcionar o trabalho a ser executado, trazendo os cuidados que devem ser tomados, prevenindo possíveis problemas e trazendo especificações de execução para evitar falhas no resultado (COREN-SE, 2017).

O protocolo de cultivo *in vitro* de plantas de alho com o objetivo adquirir plantas livres de vírus tem se tornado uma das principais aplicações práticas da cultura de tecidos vegetais em laboratórios. O uso dessa metodologia já proporcionou a obtenção de cerca de 80% plantas livres de vírus para os vírus indexados. Os resultados até o presente momento abrem uma perspectiva para melhorias e aperfeiçoamento dos protocolos existentes para cultivo *in vitro* de plantas de alho livre de viroses (MURASHIGE e SKOOG, 1962; PASQUAL et al., 2001; GUERRA e NODARI, 2006 apud MENEZES JÚNIOR, 2011; TORRES et al., 1998).

O protocolo para limpeza viral de alho é descrito por TORRES et al., 2001. conta com a formulação de preparo de meio de cultura,

explicações sobre a retirada dos ápices caulinares, assepsia, condução dos materiais em salas de crescimento e casas de vegetação.

A pouca quantidade de protocolos existentes na literatura é uma das dificuldades para a cultura de meristemas de plantas de alho. Existe uma necessidade de se aprimorar os protocolos já existentes para o pleno desenvolvimento das plantas até a bulbificação *in vitro* (SANTOS, 2022).

Este trabalho tem como objetivo testar um novo protocolo baseado no protocolo de TORRES et al., 2001 referente a metodologia do cultivo de alho *in vitro* a partir da fase de bulbificação da cultura de alho.

Materiais e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Biologia Celular da Embrapa Hortaliças, localizado na Rodovia BR 060 Km 9- Samambaia Norte, Brasília- DF, teve início no mês de julho de 2023 e finalizado em novembro de 2023.

A cultivar de alho utilizada foi a Amaranthe Branco, que possui ciclo mediano, de 5-6 meses, tem cor arroxeada na parte externa, 8-12 bulbilhos e bulbo arredondado e a cultivar ITO que possui ciclo tardio, com 6 meses ou superior, possui coloração branca na parte externa, de 7-10 bulbilhos e bulbo redondo.

A primeira etapa do experimento consistiu na extração de meristemas e desenvolvimento de parte foliar em meio nutritivo. Os explantes foram excisados em capelas de fluxo laminar e em ambiente asséptico, colocados em tubos de ensaio com meio de cultura de forma individual.

O meio de cultura utilizado para a primeira etapa do experimento foi feito da seguinte forma: 4,4g/L de Murashige e Skoog Medium (M&S); 30g/L de Sacarose; 100mg/L de Inositol; 1ml/L de

vitamina (Gamborg's Vitamin Solution 1000x) 1ml/L de 2ip (0,1); 1ml/L de AIB (0,1); 2,5g/L de Fitagel. O volume foi ajustado para 3,5 L. O pH foi ajustado para 5,7.

Após fechar com tampas de polipropileno e envolver a tampa com uma proteção de "plástico filme pvc" os frascos foram levados para sala de crescimento, com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 20°C, onde permaneceram por, aproximadamente, 2 meses, até formar parte aérea. Após esse período as plantas foram transferidas para um novo meio de cultura, onde se inicia a fase de bulbificação.

Meio de cultura usado na fase de bulbificação: 4,4g/L de Murashige e Skoog Medium (M&S); 1ml/L de vitamina (Gamborg's Vitamin Solution 1000x) 60g/L de Sacarose; 100mg/L de Inositol; 2,5g/L de Fitagel. O fitagel foi usado apenas no meio de cultura sólido. O volume final foi ajustado para 3,5L e o pH foi ajustado para 5,7.

O experimento iniciou os testes a partir da segunda fase, denominada fase de bulbificação, onde foram testadas as quantidades de meio de cultura mais adequadas para a cultura, a quantidade de plantas por frascos. Foi feita a comparação entre meio de cultura líquido e sólido para saber em qual a planta se desenvolve melhor e qual recipiente a planta apresenta melhor desempenho de bulbificação.

Os frascos de vidro utilizados continham 300ml de meio de cultura e os tubos de ensaio utilizados foram longos, com cerca de 20 cm de comprimento. Ao todo foram 10 tratamentos com 3 repetições cada. Sendo eles:

Tratamento 1: Frasco de vidro com meio de cultura sólido, 25ml de meio de cultura e 1 planta de cada cultivar (AMARANTE BRANCO e ITO).;

Tratamento 2: Frasco de vidro com meio de

cultura sólido, 25ml de meio de cultura e 2 plantas de cada cultivar (AMARANTE BRANCO e ITO).;

Tratamento 3: Frasco de vidro com meio de cultura sólido, 50ml de meio de cultura e 1 planta de cada cultivar (AMARANTE BRANCO e ITO).;

Tratamento 4: Frasco de vidro com meio de cultura sólido, 50ml de meio de cultura e 2 plantas de cada cultivar (AMARANTE BRANCO e ITO).;

Tratamento 5: Frasco de vidro com meio de cultura líquido, 25ml de meio de cultura e 1 planta de cada cultivar (AMARANTE BRANCO e ITO).;

Tratamento 6: Frasco de vidro com meio de cultura líquido, 25ml de meio de cultura e 2 plantas de cada cultivar (AMARANTE BRANCO e ITO).;

Tratamento 7: Frasco de vidro com meio de cultura líquido, 50ml de meio de cultura e 1 planta de cada cultivar (AMARANTE BRANCO e ITO).;

Tratamento 8: Frasco de vidro com meio de cultura líquido, 50ml de meio de cultura e 2 plantas de cada cultivar (AMARANTE BRANCO e ITO).;

Tratamento 9: Tubos de ensaio com meio de cultura sólido, 25ml de meio de cultura e 1 planta de cada cultivar (AMARANTE BRANCO e ITO).;

Tratamento 10: Tubos de ensaio com meio de cultura líquido, 25ml de meio de cultura e 1 planta de cada cultivar (AMARANTE BRANCO e ITO).

Os tratamentos com 1 planta tiveram três frascos por repetição e os tratamentos com duas plantas terão 2 frascos por repetição. Já os tratamentos com tubos de ensaio tiveram 4 tubos para cada repetição da cultivar ITO e 9 tubos para cada repetição da cultivar AMARANTE BRANCO.

Para os tratamentos que possuem meio de cultura líquido, foram usados filtros de papel dentro do recipiente, para que a planta não fique submersa no líquido. Todos os meios de cultura foram autoclavados a uma temperatura de 121°C.

Após o período adequado de desenvolvimento, as plantas foram colhidas e

avaliadas o comprimento das folhas e diâmetros do bulbo. Após a primeira avaliação feita no dia da colheita, as plantas foram colocadas para secar em bandejas plásticas e papel absorvente. Quando secas, foram feitas novas avaliações de peso e diâmetros dos bulbos, sendo descartado as raízes e parte aérea para pesagem, que foi feita.

Os parâmetros avaliados no experimento foram:

Comprimento de planta: Logo após a retirada do recipiente de cultivo, a planta foi medida da sua base até a extremidade da folha mais longa, com auxílio de uma régua escolar de 30 centímetros (JORGE & RODRIGUES, 2008).

Diâmetro dos microbulbos: Esse parâmetro foi avaliado em dois momentos, logo após a colheita e após a secagem dos microbulbos, que ocorreu cerca de 1 mês após a colheita. Foi utilizado um paquímetro digital para medir os diâmetros longitudinais e transversais (SLAIFFER & SARETTA, 2021).

Quantidade de folhas: Assim que os microbulbos foram retirados dos recipientes a quantidade de folhas foi contabilizada e anotada individualmente (Serafim, et al., 2023).

Peso do microbulbo: Para fazer a avaliação de pesagem dos microbulbos foi utilizada uma balança de precisão 0-250g com vidros nas laterais. Os microbulbos foram individualizados e pesados sem parte aérea e raízes, que foram retirados com auxílio de tesoura escolar (BUSO, 1978).

Para este experimento foi adotado o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), visto que o experimento ocorreu em laboratório, tendo as condições ambientais controladas e os tratamentos foram dispostos na sala de crescimento através de sorteio simples. Para este trabalho foi utilizado Análise de variância (Anova), que é utilizado para testar a igualdade de três ou mais médias populacionais, baseando-se em análises de variâncias amostrais (Edisciplinas USP- sem data). Foi usado 5% de significância limítrofe. O software estatístico utilizado foi Speed Stat 2.4.

Resultados e Discussão

Na tabela 1 observa-se que o protocolo utilizando o recipiente na forma de frasco de vidro proporcionou maior comprimento de plantas, diâmetro do microbulbo e peso do microbulbo para a cultivar de alho amarante branco. A variável número de folhas não apresentou diferença significativa entre os recipientes avaliados.

A consistência sólida e o volume de 25ml do meio de cultura no frasco de vidro proporcionaram maior comprimento de plantas, número de folhas, diâmetro e peso do microbulbo para a cultivar de alho amarante branco. Segundo GRATTAPAGLIA & MACHADO (1990), citados por CORREIA, et al., (1995), a variação de desenvolvimento *in vitro* das plantas pode estar relacionada ao tamanho dos explantes e com a posição em que o explante foi colocado no meio de cultura.

Tabela 1. Recipiente, comprimento de planta, número de folhas por planta, diâmetro e peso do microbulbo para a cultivar Amaranthe branco.

Recipiente	Comprimento da planta (cm)	Nº Folhas/Planta	Diâmetro do microbulbo (mm)	Peso do microbulbo (mg)
------------	----------------------------	------------------	-----------------------------	-------------------------

Frasco	15,94 a	4,17 a	8,46 a	417,70 a
Tubo Ensaio	11,62 b	4,23 a	6,19 b	232,64 b
Consistência do meio de cultura				
Sólido	14,83 a	4,32 a	7,68 a	399,44 a
Líquido	11,39 b	3,76 b	6,72 b	285,44 b
Volume meio de cultura (ml)				
25	14,64 a	4,28 a	7,70 a	389,41 a
50	11,58 b	3,80 b	6,71 b	295,48 b
CV(%)	21,98	17,81	18,46	30,55

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Anova a 5% de probabilidade, para cada característica separadamente. Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste Anova a 5% de probabilidade, para cada característica separadamente.

Na tabela 2 observa-se que o protocolo usando 1 planta por frasco de vidro e 25ml de meio de cultura apresentou melhor resultado em relação ao comprimento de planta.

O diâmetro do microbulbo obteve melhor resultado com 1 planta e 25ml, assim como o peso e diâmetro do microbulbo para a cultivar de alho amarante branco.

O tipo de recipiente e a quantidade de meio de cultura afetam diretamente a área de interface meio de cultura-atmosfera, o volume de ar até o meio de cultura e a profundidade. Esses fatores também afetam a fase gasosa do recipiente e, conseqüentemente, o crescimento e desenvolvimento das plantas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998, citado por NICOLOSO & ERIG, 2002).

Tabela 2. Comprimento de planta, diâmetro e peso do microbulbo da cultivar Amarante branco, de acordo com o número de plantas por frasco e volume do meio de cultura.

Comprimento da planta (cm)				
Nº plantas/Frasco	Volume meio de cultura (ml)			Cv (%)
	25ml	50ml	Média	
1	15,94 A a	10,73 B a	13,34 a	27,18
2	13,34 A a	12,43 A a	12,89 a	
Média	14,64 A	11,58 B		
Diâmetro do microbulbo (mm)				
Nº plantas/Frasco	Volume meio de cultura (ml)			Cv (%)
	25ml	50ml	Média	
1	8,46 A a	6,35 B a	7,40 a	18,45
2	6,93 A b	7,07 A a	7,00 a	
Média	7,70 A	6,71 B		
Peso do microbulbo (mg)				
Nº plantas/Frasco	Volume meio de cultura (ml)			Cv (%)
	25ml	50ml	Média	
1	456,34 Aa	266,00 A a	361,17 a	38,39
2	322,47 Ab	324,95 A a	323,71 a	
Média	389,41 A	295,48 B		

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste Anova a 5% de probabilidade, para cada característica separadamente. Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste Anova a 5% de probabilidade, para cada característica separadamente.

Na tabela 3, avaliando a cultivar ito, observa-se que o protocolo utilizando o recipiente

na forma de tubo de ensaio proporcionou maior comprimento de plantas, diâmetro e peso do

microbulbo para a cultivar de alho ito. A consistência do meio de cultura para o comprimento de planta e diâmetro do microbulbo não apresentou diferença significativa, já o peso do microbulbo apresentou melhor resultado com meio de cultura de consistência sólida.

O recipiente escolhido afeta diretamente no desenvolvimento do da cultura. Isso ocorre por conta do espaço de desenvolvimento e a profundidade de meio de cultura que a planta vai ter para crescer (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Tabela 3. Comprimento de planta, diâmetro e peso do microbulbo, de acordo com o recipiente utilizado e consistência do meio de cultura para a cultivar Ito.

Recipiente	Comprimento da planta (cm)	Diâmetro do microbulbo (mm)	Peso do microbulbo (mg)
Frasco	6,47 b	3,72 b	68,41 b
Tubo Ensaio	9,22 a	4,45 a	97,84 a
Consistência Meio Cultura			
Sólido	8,25 a	4,30 a	97,91 a
Líquido	7,44 a	3,87 a	68,34 b
CV(%)	21,20	18,24	35,79

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Anova a 5% de probabilidade, para cada característica separadamente. Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente pelo test Anova a 5% de probabilidade, para cada característica separadamente.

Na tabela 4 observou-se que o efeito da consistência do meio de cultura depende do tipo de recipiente utilizado. Para o frasco de vidro pode ser utilizado tanto meio líquido quanto o sólido. No tubo de ensaio, o uso de meio de cultura líquido proporcionou o aumento do número de folhas por planta, sendo o meio de cultura líquido mais eficiente que o meio de cultura sólido para emissão de folhas na cultivar Ito.

disponibilidade de nutrientes no meio de cultura líquido. Isso ocorre porque os nutrientes e reguladores vegetais são mais facilmente absorvidos pelas plantas em meios de culturas líquidos do que em meios de cultura semi-sólidos, ocasionando uma maior taxa de crescimento.

De acordo com DE LA VINÃ, et al., 2001, citado por MACHADO et al., 2004, o resultado descrito acima pode ocorrer por conta da maior

Tabela 4. Quantidade de folhas por planta, dependendo do tipo de recipiente utilizado e a consistência do meio de cultura para a cultivar Ito.

Consistência	Recipiente		Média
	Frasco	Tubo	
Sólido	2,67 Aa	2,99 Ab	2,83 b
Líquido	2,87 Ba	4,16 Aa	3,52 a

Média	2,77 B	3,58 A
--------------	--------	--------

Na tabela 5 o maior número de folhas por planta, para a cultivar Ito, foi alcançado quando utilizou-se o volume de 25ml de meio de cultura de consistência líquida e duas plantas por frasco.

Segundo DE LA VINÃ et al., 2001, a consistência líquida do meio de cultura pode proporcionar maior taxa de absorção por parte da planta, possibilitando maior taxa de desenvolvimento da mesma.

Tabela 5. Número de plantas por frasco de vidro, volume e consistência de meio de cultura para a cultivar Ito.

Nº plantas/Frasco	Volume meio de cultura (ml)	
	25	50
1	2,77 A b	2,81 A a
2	3,29 A a	2,65 B a
Nº plantas/Frasco	Consistência meio de cultura (ml)	
	Sólido	Líquido
1	2,71 A a	2,87 A b
2	2,54 B a	3,40 A a

CV (%) = 20,05

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste Anova a 5% de probabilidade para cada característica separadamente. Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste Anova a 5% de probabilidade para cada característica separadamente.

Na tabela 6 não houve diferença significativa entre o volume de 25ml e 50ml de meio de cultura de consistência sólida no resultado do diâmetro e peso do microbulbo. Para o meio de cultura com 25ml, o diâmetro e peso do microbulbo apresentou melhor resultado na consistência líquida.

Em um trabalho realizado com *P. glomerata* os autores (NICOLOSO & ERIG)

obtiveram o resultado de que recipientes de tamanhos médios ou grandes são poucos práticos para a produção de muda em grande escala, por isso recomendou-se a utilização de recipientes pequenos. Neste trabalho, foi observado que não houve diferença entre os volumes de meios testados nos frascos de vidro na consistência sólida. Já para a consistência líquida, houve melhor resultado com 25ml.

Tabela 6. Diâmetro e peso do microbulbo da cultivar Ito de acordo com o volume de meio de cultura.

Diâmetro dos microbulbos (mm)		
Volume meio de cultura (ml)	Consistência meio de cultura	
	Sólido	Líquido
25	4,10 A a	3,80 A b
50	3,91 B a	4,57 A a
Peso do microbulbo (mg)		
Volume meio de cultura (ml)	Consistência meio de cultura	
	Sólido	Líquido
25	85,20 A a	73,95 A b
50	71,21 B a	101,71 A a

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste Anova a 5% de probabilidade para cada característica separadamente. Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste Anova a 5% de probabilidade de probabilidade, para cada característica separadamente.

Na tabela 7 observou-se que duas plantas por frasco apresentaram maior desempenho em relação ao diâmetro e peso dos microbulbos da cultivar Ito. Uma possível hipótese de explicação destes resultados pode ser devido a quantidade

de meio de cultura disponível para as plantas dentro do frasco e por conta da facilidade de absorção de nutrientes e desenvolvimento da cultivar Ito.

Tabela 7. Quantidade de plantas por frasco de vidro da cultivar Ito.

Nº plantas/Frasco	Diâmetro dos microbulbos (mm)
1	3,89 b
2	4,30 a
Nº plantas/Frasco	Peso do microbulbo (mg)
1	58,22 b
2	92,81 a

CV (%) = 15,25 (diâmetro)

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste Anova a 5% de probabilidade de probabilidade, para cada característica separadamente. Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste Anova a 5% de probabilidade, para cada característica separadamente.

Conclusão:

Para a cultivar Amaranthe branco recomenda-se a utilização de frasco de vidro, contendo 25 ml de meio de cultura de consistência sólida. A quantidade de plantas por frasco pode ser tanto 1 ou duas, não trazendo diferença significativa para os resultados.

Para a cultivar Ito recomenda-se o uso dos tubos de ensaio, contendo uma planta, meio de cultura nas consistências líquidas ou sólidas com volume de 25 ml ou 50 ml.

Para testes semelhantes em outras cultivares de alho, recomenda-se usar cultivares com características semelhantes às duas cultivares testadas para obter resultados

parecidos.

Agradecimentos:

Gostaríamos de agradecer a Deus por ser nossa força e alicerce. Agradecemos um ao outro por todo companheirismo, paciência e dedicação. Aos nossos pais, irmãos e familiares, agradecemos. Aos nossos professores, obrigado por nos transmitir o conhecimento necessário para construirmos nossas carreiras. Agradecemos a Embrapa Hortaliças, em especial o Dr. Francisco Vilela Resende, Sarita Mazutti Meireles e Cristiane Jerônimo da Silva, por ter nos orientado, ensinado e permitido a realização do trabalho.

Referências:

ANDRADE, S. R. M. Princípios da Cultura de Tecidos Vegetais. **Circular técnica nº 58- Embrapa Cerrados**. Planaltina-DF, 2002. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/546466/principios-da-cultura-de-tecidos-vegetais>> Acesso em: 03/08/2023

BUSO, J, A. Estimativas de parâmetros genéticos de caracteres de plantas e bulbo de cebola (*Allium cepa* L.). **Livraria Digital USP**. Piracicaba-SP, 1978. Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-20210919-102038/en.php>> Acesso em: 20/11/2023.

CARVALHO, J.M.F.C.. **Aplicacion de las tecnicas de cultivo in vitro en la multiplicación y mejora del algodón (Gossypium hirsutum L)**. 1996. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônoma) – Departamento de Biologia Vegetal, Escuela Tecnica Superior de Ingenieros Agronomos de la Universidad Politecnica de Madrid. Madrid- Espanha, 1997. Disponível em: <<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=237602>>

CARVALHO, J. M. F.; SILVA, M. M. A.; MEDEIROS, M. J. L. Fatores inerentes à Micropropagação. **Circular técnica nº 148- Embrapa Algodão**. Campina Grande-PB, 2006. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPA/18325/1/DOC148.pdf>> Acesso em: 03/08/2023

EQUIPE EDITORIAL DE CONCEITO.DE- **Protocolo- O que é, conceito e definição**. Disponível em: <<https://conceito.de/protocolo>>. Acesso em 20/10/2023.

CONSELHO REGIONAL DE ENFERMAGEM DE SERGIPE- Protocolos assistenciais. **Portal Cofen**. Aracaju-SE, 2017. Disponível em: <<http://se.corens.portalcofen.gov.br/wp-content/uploads/2017/02/MODELO-PROTOCOLOS-ASSISTENCIAIS.pdf>> Acesso em: 23/11/2023

CORREIA, D.; GONÇALVES, A., N.; COUTO, H., T., Z.; RIBEIRO, M., C. **Efeito do meio de cultura líquido e sólido no crescimento e desenvolvimento de gemas de *Eucalyptus grandis* X *Eucalyptus urophylla* na multiplicação *in vitro***. IPEF n.48/49, p.107-116, jan./dez.1995. Piracicaba-SP, 1995. Disponível em: <<https://www.ipef.br/publicacoes/scientia/nr48-49/cap11.pdf>> Acesso em: 03/12/2023.

DE LA VIÑA, G.; BARCELÓ-MUÑOZ, A.; PLIEGO-ALFARO, F. Effect of culture media and irradiance level on growth and morphology of *Persea americana* Mill microcuttings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 65, p. 229-237, 2001. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/227032458_Effect_of_culture_media_and_irradiance_level_on_growth_and_morphology_of_Persea_americana_Mill_microcuttings> Acesso em: 01/12/2023.

FERNANDES, F. R. Medidas gerais de controle das viroses em alho. **Nosso Alho- Associação Nacional dos Produtores de Alho (ANAPA)**. Brasília-DF, Edição nº 15, p-35-37, 2012. Disponível em: <<http://anapa.com.br/revista/page/2/#>> Acesso em: 05/11/2023

FILGUEIRA, F. A. R.; Novo Manual de Olericultura. Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. **3ª Edição. Editora UFV.** Viçosa-MG, p 270-272, 2008.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A; TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas.** Embrapa-SPI/Embrapa-CNPq, 1998. v. 1, p. 183-260. Brasília-DF.

GRUNDLING, R. D. P.; GAZZOLA, R.; ARAGÃO, A. A. Mercado Mundial do alho: tendências gerais e as implicações para o Brasil. **59º Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. 6º Encontro Brasileiro de Pesquisadores em Cooperativismo.** Brasília-DF, 2021. Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1142479/1/ALHO-SOBER-2021.pdf>> Acesso em: 05/11/2023

HABER, L. L.; RESENDE, F. V.; PEREIRA, J. L.; OLIVEIRA, N. A.; PEREIRA, A. R. **Aprenda como se faz: Alho-semente.** Brasília-DF, 2013. Disponível em: <infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/988501> Acesso em: 03/10/2023

JORGE, L, A, C; RODRIGUES, A, F, O. Safira: Sistema de Análise de Fibras e Raízes. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento nº 24, Embrapa.** São Carlos-SP, 2008. Disponível em: < <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/31890/1/BPD242008.pdf>> Acesso em: 20/11/2023.

LONGO, A. E. O.; SIQUEIRA, W. J.; PASSOS, I. R. S.; SCOTT, M. D. S.; AZEVEDO FILHO. **Micropropagação e bulbificação in vitro de alho (*Allium sativum* L.).** Plant Cell Cult Micropropag., Lavras-MG, v. 8, n 1-2, p. 18-26, 2012. Disponível em:< <http://pccm.ufla.br/index.php/plantcellculturemicropropagation/article/view/60>>. Acesso em: 01/10/2023.

MACHADO, M., P.; CARVALHO, D., C.; BIASO, L., A. Multiplicação in vitro do porta-enxerto de macieira 'Marubakaido' em diferentes meios de cultivo e concentrações de ácido giberélico. Scientia Agraria, vol. 5, núm. 1-2, 2004, pp. 69-72. Paraná. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/pdf/995/99517145010.pdf>> Acesso em: 02/12/2023.

MELO, W. F. **Inovação Tecnológica na Agricultura: Condicionantes da dinâmica da tecnologia “alho-semente livre de vírus” nas regiões de Cristópolis e Boninal, na Bahia.** Dissertação (Mestrado Profissional em Desenvolvimento Sustentável)—Universidade de Brasília. Brasília-DF, 2008. Disponível em: <<https://repositorio.unb.br/handle/10482/3590>> Acesso em: 07/09/2023

MELO, W. F.; RESENDE, F. V.; GUIDUCCI FILHO, E. G.; DUSI, A. N. Da Banca ao agricultor: A transferência da tecnologia de alho livre de vírus aos agricultores familiares da Bahia. **Cadernos de ciência e tecnologia,** Brasília – DF, v.28, n.1, p 81-114,2011. Disponível em: < <https://seer.sct.embrapa.br/index.php/cct/article/view/12036/6601> > Acesso em: 07/09/2023

MENEZES JÚNIOR, F. O. G. Cultivo in vitro visando a limpeza clonal. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages-SC, V. 10, n 2, p. 155-167, 2011. Disponível em: <<https://www.revistas.udesc.br/index.php/agroveterinaria/article/view/5280>>. Acesso em: 23/11/2023

MITUTI, T. **Levantamento das principais viroses na cultura do alho (*Allium sativum* L.) e a caracterização de Carlavirus em algumas regiões produtoras do Brasil**. Botucatu-SP, 2009. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/97209/mituti_t_me_botfca.pdf?sequence=1> Acesso em: 08/11/2023

MOTA, J. H.; SOUZA, R. J.; YURI, J. E.; REZENDE, G. M.; TEIXEIRA, I. R. Similaridade morfológica de cultivares de alho. **Revista científica eletrônica de agronomia**, nº8, dezembro de 2005, Brasília-DF. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/132238/1/Separata00323.pdf>> Acesso em: 07/09/2023

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum, Copenhagen**, v.15, p.473-497, 1962. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>>

NICOLOSO, F., T; ERIG, A., C. Efeito do tipo de segmento nodal e tamanho do recipiente no crescimento de plantas de *Pfaffia glomerata in vitro*. **Ciênc. agrotec., Lavras. Edição Especial**, p.1499-1506, dez., 2002. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Fernando-Nicoloso/publication/228455198_Efeito_do_tipo_de_segmento_nodal_e_tamanho_do_recipiente_no_crescimento_de_plantas_de_Pfaffia_glomerata_in_vitro/links/00463516474b227601000000/Efeito-do-tipo-de-segmento-nodal-e-tamanho-do-recipiente-no-crescimento-de-plantas-de-Pfaffia-glomerata-in-vitro.pdf> Acesso em: 02/12/2023.

RESENDE, F. V. **Comportamento, em condições de campo, de plantas de alho (*Allium sativum* L.) obtidas por cultura de meristemas**. 63 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras-MG, 1993. Disponível em: <<http://177.105.2.185/handle/1/35685>> Acesso em: 04/10/2023.

RESENDE, F. V.; HABER L. L.; PINEHIRO, J. B. **A cultura do alho**. Brasília-DF, 2014. Disponível em: <embrapa.br/documents/1355126/9124396/Sistema+de+Produção+de+Alho/64258d94-6bb8-4826-a0e9-ec47aa434ff> Acesso em: 25/10/2023

RESENDE, F. V.; MELO, W. F.; GUIDUCCI FILHO, E.; DUSI, A. N. Produção de alho-semente livre de vírus em pequenas propriedades. **Circular técnica nº 99- EMBRAPA HORTALIÇAS**, Brasília-DF, 2011.

Disponível em: <
<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/916712/producao-de-alho-semente-livre-de-virus-em-pequenas-propriedades>>. Acesso em: 25/10/2023

SANTOS, A. P. Otimização do protocolo para obtenção *in vitro* de microbulbos de *Allium sativum* das cultivares livre de vírus ITO e QUITÉRIA. Dissertação (Mestrado Agronomia). p.1-16. **Universidade Federal de Uberlândia**. Uberlândia-MG, 2022. Disponível em: < <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/36429>>. Acesso em: 01/09/2023.

SLAIFFER, H; SARETTA, E. Determinação do bulbo molhado em gotejamento superficial e subsuperficial para cachoeira do sul-RS. **Irriga, Botucatu, Edição Especial** – Sul, v. 1, n. 2, p. 421-430. Julho, 2021. Disponível em: <https://revistas.fca.unesp.br/article/download>. Acesso em: 20/11/2023.

SCOTTON, D. C. **Otimização do cultivo *in vitro* visando a transformação genética das cultivares brasileiras de alho (*Allium sativum* L.)**. Piracicaba-SP, 2007. Disponível em: < <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64133/tde-18122007-150749/pt-br.php>> Acesso em: 27/09/2023

SERAFIM, V. C., MARTINS, D. C.; SANTOS, I. P. Avaliação do desenvolvimento de cultivares de alface nas estações do ano no município de Santa Fé do Sul – São Paulo. **Revista Brasileira de Desenvolvimento**. Curitiba-PR, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.34117/bjdv9n9-008>> Acesso em: 23/11/2023

TORRES, A. C. DUSI, A, N; RESENDE, R, O; BUSO, J, A. Produção de alho-semente com alta qualidade fitossanitária mediante cultura de ápices caulinares. **Circular técnica nº 27- Embrapa Hortaliças**. Brasília-DF, 2001. Disponível em < <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/772155/producao-de-alho-semente-com-alta-qualidade-fitossanitaria-mediante-cultura-de-apices-caulinares>>. Acesso em: 04/11/2023

TORRES, A., C.; CALDAS, L., S.; BUSO, J., A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. **SPI-Embrapa**. Brasília-DF, 1998. Disponível em: <<http://livimagens.sct.embrapa.br/amostras/00064610.pdf>> Acesso em: 15/12/2023.

VIEIRA, R. L. Aspectos fisiológicos e fitossanitários na micropropagação para obtenção de alho-semente livre de vírus. **Repositório Institucional-UFSC Tese de doutorado**. P. 27-114. Florianópolis-SC, 2012. Disponível em: < <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/100859>> Acesso em: 08/11/2023

VIEIRA, R. L.; SILVA, A. L.; ZAFFARI, G. R.; FELTRIM, A. L.; WAMSER, A. F., Indução e desenvolvimento de bulbos de alho *in vitro* por meio da vernalização e da variação do fotoperíodo. **Revista Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v.26, n.3, p.81-85, 2020. Disponível em: <<https://publicacoes.epagri.sc.gov.br/RAC/article/view/624>> Acesso em: 26/09/2023

VIEIRA, R. L. **Caracterização genética dos acessos do banco ativo de germoplasma de alho (*Allium sativum* L.) de Santa Catarina.** Florianópolis-SC, 2004. Disponível em: <
<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/87450> > Acesso em: 25/10/2023