

CELIA TACACO ARIMURA

MICROPROPAGAÇÃO DE GENGIBRE (*Zingiber officinale* Roscoe)
VIA ORGANOGÊNESE E EMBRIOGÊNESE

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-graduação
em Fitotecnia, para obtenção do título de
“*Doctor Scientiae*”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2001

“O Senhor é a porção da minha herança e o meu cálice; tu
sustentas a minha sorte”. (Salmos 16:5)

A Deus, único e soberano.

Ao Adilécio.

Aos meus pais e irmãos.

Com gratidão, dedico.

AGRADECIMENTO

A Deus, por tudo que tenho e tudo que sou.

A conclusão deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração e o estímulo recebido de um grupo de amigos, com os quais partilho o êxito desta realização.

Ao Adilécio, pelo amor, e por servir-me de suporte em todos os momentos.

A meus pais, pelo incentivo e encorajamento.

A meus irmãos Márcia, Edson, Eliane e Nilson, pelo carinho e amizade.

Ao Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do Curso.

A EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia, pela oportunidade de realização dos experimentos.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Fernando Finger pela orientação, pelos ensinamentos e pelo incentivo.

Ao Dr. João Batista Teixeira pela orientação, pelas sugestões, pelos ensinamentos, e pelo apoio.

Aos professores Mário Puiatti, Vicente Wagner Dias Casali, Wagner Otoni e Denise Cunha Dias, pelas correções, pelas sugestões, e pelos ensinamentos.

Aos amigos do CENARGEN, Marcelo, Cláudia, Andréa Rachel, Sarah, Cristina, Laudete, Lucimeire, D. Isabel, Dr. Pedro, André, Jairo, Fabrício's, pela amizade, pelo carinho e pela agradável convivência.

Aos amigos do Departamento de Fitotecnia, Geraldo Júlio, Ribeiro, Mara, Vicente, Domingos, pela amizade, e pelo apoio.

Aos amigos da Fundação Educacional de Ituiutaba da Universidade do Estado de Minas Gerais, pelo incentivo, e pelo apoio.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

BIOGRAFIA

CELIA TACACO ARIMURA, filha de João Hidemori Arimura e de Neusa Haruko Arimura, nasceu em 7 de maio de 1971, em Uraí, Estado do Paraná.

Em fevereiro de 1995, diplomou-se Engenheira-Agrônoma, pela Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa – MG.

Em março de 1995, iniciou o Curso de Mestrado em Fitotecnia, na Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em julho de 1997.

Em agosto de 1997, iniciou o Curso de Doutorado em Fitotecnia, na Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em setembro de 2001.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1- Utilizações do gengibre.....	1
1.2- Estrutura da planta.....	2
1.3- Propagação.....	3
1.4- Cultivo.....	4
1.5- Principais doenças.....	5
1.6- Melhoramento.....	7
1.7- Referências bibliográficas.....	8
2- ARTIGOS CIENTÍFICOS	
2.1- Desenvolvimento <i>in vitro</i> de gengibre em meio com ANA e BAP.....	12
2.1.1- Introdução.....	13
2.1.2- Material e Métodos.....	14
2.1.3- Resultados e Discussão.....	15
2.1.4- Referências Bibliográficas.....	19
2.2- Efeito de BAP e CIN no cultivo <i>in vitro</i> de gengibre.....	21
2.2.1- Introdução.....	21
2.2.2- Material e Métodos.....	23
2.2.3- Resultados e Discussão.....	24
2.2.3.1- Número de brotações.....	24
2.2.3.2- Número de raízes.....	25
2.2.4- Referências Bibliográficas.....	27

2.3-	Embriogênese somática e regeneração de plantas de gengibre.....	37
2.3.1-	Introdução.....	37
2.3.2-	Material e Métodos.....	39
2.3.2.1-	Fase de indução de calos.....	39
2.3.2.2-	Fase de diferenciação dos calos embriogênicos.....	40
2.3.2.3-	Fase de germinação dos embriões somáticos e desenvolvimento das plântulas.....	40
2.3.3-	Resultados e Discussão.....	41
2.3.3.1-	Fase de indução de calos.....	41
2.3.3.2-	Fase de diferenciação dos calos embriogênicos.....	44
2.3.3.3-	Fase de germinação dos embriões somáticos e desenvolvimento das plântulas.....	47
2.3.4-	Referências Bibliográficas.....	48
2.4-	Comparação de rizomas de gengibre originados da propagação convencional e de mudas micropropagadas.....	57
2.4.1-	Introdução.....	57
2.4.2-	Material e Métodos.....	59
2.4.3-	Resultados e Discussão.....	61
2.4.3.1-	Peso da matéria fresca e seca.....	62
2.4.3.2-	Número de gemas.....	63
2.4.3.3-	Composição mineral.....	65
2.4.4-	Referências Bibliográficas.....	66

RESUMO

ARIMURA, Celia Tacaco, D. S., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2001. **Micropropagação de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) via organogênese e embriogênese.** Orientador: Fernando Luiz Finger. Conselheiros: João Batista Teixeira e Vicente Wagner Dias Casali.

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de reguladores de crescimento na multiplicação de gemas de gengibre; obter plantas via embriogênese somática e comparar rizomas de mudas micropropagadas e de propagação convencional. Avaliou-se o crescimento e desenvolvimento de gemas de gengibre em níveis de KIN e BAP e observou-se que com 30 dias de cultivo não houve efeito na multiplicação de gemas e no enraizamento. Aos 90 dias de cultivo, a melhor resposta de número de brotações foi em 6,2 e 3,5 μM de BAP e KIN, respectivamente. Mesmo na ausência de citocinina, houve formação do sistema radicular. Em outro experimento, estudou-se a interação de níveis de ANA e BAP e a melhor combinação foi 1,34 μM de ANA e 2,22 μM de BAP, pelo maior número de brotos e raízes e maiores pesos de matéria fresca e seca. A embriogênese somática foi realizada em 3 fases: indução de calos em segmentos foliares, diferenciação de calos embriogênicos em embriões somáticos e germinação dos embriões somáticos. Os calos formados foram subcultivados a cada 30 dias e os calos embriogênicos foram isolados e subcultivados para

multiplicação. No meio de cultura contendo maltose e no escuro, 100% dos calos embriogênicos se diferenciaram em embriões somáticos. A melhor taxa de germinação dos embriões foi em meio de cultura contendo metade da concentração dos sais do meio MS na presença ou ausência de carvão ativado. Os rizomas formados por mudas micropropagadas foram comparados com os rizomas de propagação convencional durante quatro ciclos de cultivo. No primeiro ciclo os rizomas formados por mudas micropropagadas foram menores e com maior número de gemas. Nos plantios subsequentes estas diferenças foram minimizadas, visto que, no terceiro e quarto cultivo não houve diferença significativa quanto ao número de gemas dos rizomas.

ABSTRACT

ARIMURA, Celia Tacaco, D. S., Universidade Federal de Viçosa, September, 2001. **Micropropagation of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) through organogenesis and embriogenesis.** Adviser: Fernando Luiz Finger. Committee Members: João Batista Teixeira e Vicente Wagner Dias Casali.

The objective of this study was to evaluate the influence of growth regulators on the sprouting of buds of ginger, obtain plantlets via somatic organogenesis and to compare some morphological characteristics in the rhizomes obtained by conventional and *in vitro* propagation. Any possible influence of KIN and BAP on buds growth and development was absent after 30 days on the media in both growth and rooting. At 90 days of growth the plantlets in 6.2 or 3.5 μM BAP and KIN showed higher number of sprouts. Even in the absence of kinetin there was formation of root system. In another experiment, it was analyzed the interaction between levels of ANA and BAP, and best combination was for 1.34 μM ANA and 2.22 μM BAP due to higher number of sprouts and roots, and bigger accumulation o fresh and dry weights. Somatic embryogenesis was done in three phases: induction of callus in leaf segments, differentiation of embryogenic callus and germination of such callus. The differentiated callus was sub-cultured at every 30 days and the embriogenic callus were isolated and sub-cultured for multiplication. In the growing media containing maltose and in the dark, 100% of the embriogenic callus differentiated in somatic embryos. The best germination

rate was in the growing media containing half of the salt concentration for the MS media in presence or absence of activated charcoal. The rhizomes from micro propagation plants were compared with those propagated conventionally throughout four growing seasons. In the first cycle the matured rhizomes from micro propagated plantlets were smaller, but in a higher number per plant. In the subsequent cycles these differences were less accentuated, since in the third and fourth cycle of growth there was no differences regarding the number of buds in the rhizomes.

1- INTRODUÇÃO GERAL

1.1- UTILIZAÇÕES DO GENGIBRE

O gengibre tem sido utilizado na Ásia desde a antiguidade como alimento condimentar. Foi um dos primeiros condimentos orientais conhecidos na Europa e sua demanda atualmente ainda é grande. Os rizomas secos, os quais são fragmentados e descascados antes da secagem, constituem o condimento que é muito estimado pelo aroma, sabor e pungência. Nos países ocidentais, os rizomas são utilizados na preparação de pães, bolos, biscoitos, sopas e conservas. É constituinte freqüente do “curry”, que é largamente utilizado na culinária chinesa. Os rizomas são também utilizados na produção de bebidas como cervejas, refrigerantes e vinhos (GUENTHER, 1975).

O odor característico dos rizomas de gengibre é devido a presença de óleo volátil, também chamado óleo essencial, que representa de 1 a 3% do peso da matéria seca, localizado principalmente no tecido da epiderme. Este óleo essencial é formado pela mistura de componentes, que podem ser isolados

pela hidro-destilação e são utilizados na indústria de essências e perfumaria. Os princípios pungentes também presentes nos rizomas, não são voláteis e devem ser extraídos por percolação com solventes adequados, cujo procedimento produz a chamada oleorresina do gengibre. A oleorresina contém os princípios pungentes fenólicos do gengibre os quais representam 4,5–7,5% do peso seco, e são utilizados como condimentos e fins medicinais (ZARATE e YEOMAN, 1996; CORRÊA JUNIOR et al., 1994).

É utilizado como medicamento principalmente na Índia e no extremo oriente. Os rizomas possuem algumas propriedades como estimulante carminativo, antiúlcera, anti-fúngico, inibidor da biossíntese de prostaglandina, anti-rinoviral, inseticida e com atividade antioxidante (CHARLES et al., 2000; MARTINS et al., 2000).

1.2- ESTRUTURA DA PLANTA

Erva perene e delgada, com 30-100 cm de altura, com rizomas ramificados robustos que crescem horizontalmente próximos à superfície do solo e contém brotações foliares. Os rizomas são grossos e rígidos, comprimidos lateralmente, ramificam em forma palmada, aproximadamente com 1,5-2,5 cm de diâmetro, com coloração interna palha, coberta com pequenas escamas de inserção circular, e com finas raízes fibrosas nas camadas superficiais do solo (MARTINS et al., 2000).

As folhas das brotações anuais são eretas, com aproximadamente 50 cm de comprimento, 5 mm de diâmetro, formadas por longas bainhas foliares, glabros com exceção de pêlos curtos próximos à base de cada lâmina foliar,

normalmente carregando 8-12 folíolos; lâmina fina, subséssil, linear-lanceolada, verde mais escuro acima e mais clara abaixo, estreitando-se eventualmente no ápice fino, com base obtusa ou arredondada, lígula larga, estreita, glabra, aproximadamente 5 mm de comprimento e levemente bilobada (TOMLINSON, 1956).

As inflorescências são raramente vistas na maioria dos países produtores, surgindo diretamente dos rizomas aromáticos, com 15–25 cm de comprimento, escapo delgado, com 10–20 cm de altura, acima da bainha com ou sem a folha apical. A inflorescência é cilíndrica, classificada como uma espiga em forma de cone medindo 4-7 cm de comprimento por 1,5-2,5 cm de diâmetro (PILLAI et al., 1978).

1.3- PROPAGAÇÃO

Em condições normais não há formação de sementes, por isso a propagação sexuada do gengibre não é utilizada. Problemas relacionados à formação das estruturas florais e defeitos durante a megasporogênese e microsporogênese são responsáveis pela ausência de sementes nesta espécie (PILLAI et al., 1978; PANDEY et al., 1997).

O gengibre é propagado vegetativamente por porções de rizomas denominadas “rizomas-sementes” usualmente com 2,5 a 5 cm de comprimento, contendo no mínimo uma gema viável. Aproximadamente 840–1700 kg de “gengibre semente” são necessários no plantio de 1 hectare.

Os “rizomas-sementes” podem ser armazenados antes do plantio, visando quebra de dormência das gemas (PILLAI e KUMAR, 1982).

Na cultura de tecidos têm-se importante instrumento de propagação de plantas que traz como vantagens a limpeza clonal, a uniformidade das plantas micropropagadas e supera problemas ocasionados pela dormência das gemas. A cultura de tecidos do gengibre tem sido estudada visando os seguintes propósitos: limpeza clonal (DE LANGE et al., 1987; SHARMA et al., 1994), produção de metabólitos secundários *in vitro* (SAKAMURA et al., 1986; SAKAMURA e SUGA, 1989; ZARATE e YEOMAN, 1996) e micropropagação, pela multibrotação de gemas (IKEDA e TANABE, 1989; BALACHANDRAN et al., 1990; SHARMA e SINGH, 1995; ARIMURA et al., 2000), organogênese (BABU et al., 1992; ROUT e DAS, 1997) e embriogênese somática (KACKAR et al., 1993; BABU et al., 1996; FREITEZ e CÁSARES, 1997).

1.4- CULTIVO

É considerado como cultura pioneira. Na Jamaica e na Austrália, o cultivo é desenvolvido em pequenas propriedades, em áreas de 0,2 a 4,0 hectares (GUENTHER, 1975). No Brasil, segundo os últimos dados disponíveis em 1996 no IBGE (2001) cerca de 86,1% da produção brasileira de gengibre foi obtida em áreas inferiores a 50 hectares.

Na produção de rizomas de bom formato, recomenda-se boa aração antes do plantio, pois em solos compactados os rizomas são freqüentemente mal-formados. Na Índia e Jamaica, o plantio é normalmente realizado no mês de maio; na Austrália no mês de setembro e no Brasil, no estado de São Paulo, o

plantio é realizado no mês de agosto e a colheita a partir de junho. O espaçamento normal é 23-30 x 15-23 cm, e os “rizomas-sementes” são plantados normalmente em sulcos com profundidade de 5 a 10 cm (GUENTHER, 1975).

O cultivo do gengibre é intensivo tendo grandes benefícios pela aplicação de esterco. Recomenda-se a aplicação de 25-30 toneladas/hectare de esterco de bovinos, 36 kg/hectare de N e P_2O_5 e 80 kg/hectare de K_2O aplicados durante o crescimento. A primeira brotação aparece aproximadamente após 10 dias do plantio. Plantas invasoras devem ser controladas. A colheita é feita 9-10 meses após o plantio quando as folhas começam a secar e o talo perde a rigidez. Os rizomas são colhidos antes da maturação completa quando forem destinados a indústria de conservas, pois se tornam mais fibrosos e mais pungentes, sendo mais adequados, neste caso, à produção do gengibre seco. Os rizomas são normalmente colhidos manualmente.

A produtividade é muito variável, mas, com o incremento das práticas culturais, 20-30 toneladas/ha de rizomas frescos podem ser colhidos. Na Jamaica, são produzidos de 5-7,5 toneladas/ha de rizomas secos; na Índia de 7,5-10 toneladas/ha e na Austrália em cultivo irrigado, 38 toneladas/ha de rizomas fresco. O gengibre fresco rende de 20-30% do respectivo peso.

1.5- PRINCIPAIS DOENÇAS

Existem diversas doenças na cultura do gengibre. A podridão dos rizomas foi reconhecida pela primeira vez em Queensland em 1930. Investigações posteriores em 1942 revelaram que o organismo causador era o

Fusarium oxysporium f. sp. *zingiberi* responsável pelas maiores perdas de produção na cultura do gengibre (PEGG et al., 1974; PANDEY et al., 1997).

Quando os rizomas são cultivados em solos recentemente utilizados para fins agrícolas, a *Armillariella mellea* às vezes aparece, causando a podridão dos rizomas. O ataque deste fungo causa o amarelecimento da haste, muito similar ao sintoma de plantas infectadas com o *Fusarium*. O fungo *Sclerotium rolfsii* também é agente causador de podridões em hastes e rizomas. Este fungo é visível na forma de algodão branco na superfície dos rizomas e forma eventualmente pequenos corpos chamados de escleródios que se assemelham a pequenas estruturas circulares de cor escura (PEGG et al., 1974).

Manchas foliares causadas por *Colletotrichum zingiberis* e *Phyllosticta zingiberi* têm sido documentadas na Ásia, e *Coniothyrium zingiberi* nas Filipinas. *Pythium* spp. causa podridão mole nos rizomas, as principais espécies são o *P. aphanidermatum*, *P. butleri*, *P. gracile*, *P. myriotylum* e *P. nigritolum*. As podridões vermelha e negra, nas Filipinas, são causadas pelo *Nectriella zingiberi* e *Rosellinia zingiberi*, respectivamente (PANDEY et al., 1997).

A bactéria *Ralstonia solanacearum* é responsável pela murcha bacteriana no gengibre, havendo dois tipos, biótipo III e biótipo IV. As duas doenças causadas pelos dois biótipos não podem ser distinguidas a campo pelos sintomas foliares, mas a distinção é feita, freqüentemente, pela observação da incidência e pela taxa de desenvolvimento (PEGG et al., 1974; BABU et al., 1992).

A podridão mole é causada pela bactéria *Erwinia carotovora*, que está presente em muitos solos. Esta infecção não causa grandes problemas no campo, pois ocorre somente em solos alagados. Entretanto, tem sido responsável por sérias perdas no armazenamento do gengibre (PEGG et al., 1974).

Os nematóides *Meloidogyne javanica* e *M. incognita* são importantes pragas e causam grandes prejuízos à cultura, principalmente em regiões de primeiro cultivo. O melhor controle deve ser o plantio de rizomas livres de nematóides em solos também sem contaminações (DE LANGE et al., 1987).

1.6- MELHORAMENTO

O gengibre é sempre propagado vegetativamente e o número de clones de gengibre existentes são limitados. Em cada centro de produção um tipo distinto de gengibre é produzido, porém as diferenças fenotípicas entre cada centro, podem ser devidas ao solo, clima e diferenças culturais, assim como o método de preparação dos rizomas. Clones têm sido reconhecidos na Índia, os quais variam no conteúdo de fibra dos rizomas e na produtividade.

Os rizomas grandes, com coloração brilhante, quebradiços, com bom aroma e poucas fibras alcançam melhores preços e essas características podem ser selecionadas juntamente com alta produção e resistência a doenças. No entanto, poucos trabalhos de seleção têm sido realizados. As hibridações entre espécies relacionadas ou mesmo entre clones têm sido pouco tentadas devido ao difícil florescimento e porque a produção de sementes raramente ocorre (PANDEY et al., 1996; KACKAR et al., 1993).

Além da seleção, outra alternativa seria a transformação genética do gengibre com a introdução de genes de interesse. Visando principalmente a introdução de genes de resistência às doenças da cultura, que são responsáveis por grandes perdas, HOSOKI e SAGAWA (1977) estimaram que a produção pode triplicar somente com o controle das doenças *Ralstonia solanacearum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *zingiberi* e *Pythium*.

1.7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFIAS

ARIMURA, C.T., FINGER, F.L., CASALI, V.W.D. A fast method for in vitro propagation of ginger. **Tropical Science**, v.40, p.86-91, 2000.

BABU, K.N., SAMSUDEEN, K., RATNAMBAL, M.J. *In vitro* plant regeneration from leaf-derived callus in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.29, p.71-74, 1992.

BABU, K.N., SAMSUDEEN, K., RATNAMBAL, M.J., RATNAMBAL, P.N., Embryogenesis and plant regeneration from ovary derived callus cultures of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) **Journal of Spices and Aromatic Crops**, v.5, n.2, p.134-138, 1996.

BALACHANDRAN, S.M., BRAT, S.R., CHANDEL, K.P.S. In vitro clonal multiplication of turmeric (*Curcuma* spp) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). **Plant Cell Report**, v.8, p.521-524, 1990.

CHARLES, R., GARG, S.N., KUMAR, S. New gingerdione from the rhizomes of *Zingiber officinale*. **Fitoterapia**, v.71, p.716-718, 2000.

CORRÊA JUNIOR, C., MING, L.C., SCHEFFER, M.C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 151p.

DE LANGE, J.H., WILLER, P., NEL, M. Elimination of nematodes from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) by tissue culture. **Journal of Horticultural Science**, v.62, p.249-252, 1987.

FREITEZ, Y.H., CÁSAIRES, J.P. Micropropagación del jengibre (*Zingiber officinale* R.) por organogénesis y embriogénesis. **Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort.**, v.41, p.70-76, 1997.

GUENTHER, E. **The essential oils**. New York: Robert e Krieger Publishing Company, 1975. 507 p.

HOSOKI, T., SAGAWA, Y. Clonal propagation of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) through tissue culture. **HortScience**, v.12, n.5, p.451-452, 1977.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: www.sidra.ibge.gov.br. acesso em: julho de 2001.

IKEDA, L.R., TANABE, M.J. In vitro subculture applications for ginger. **HortScience**, v.24, n.1, p.142-143, 1989.

KACKAR, A., BHAT, S.R., CHANDEL, K.P.S., MALIK, S.K. Plant regeneration via somatic embryogenesis in ginger. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.32, p.289-292, 1993.

MARTINS, E.R., CASTRO, D.M., CASTELLANI, D.C., DIAS, J.E. **Plantas Medicinais**. 1.ed. Viçosa: UFV, 2000. 220 p.

PANDEY, Y. R., SAGWANSUPYAKORN, C., SAHAVACHARIN, O., THAVEECHAI, N. Influence of photoperiods on dormancy and rhizome

formation of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Kasetsart Journal**, v.30, p.386-391, 1996.

PANDEY, Y. R., SAGWANSUPYAKORN, C., SAHAVACHARIN, O., THAVEECHAI, N. Effect of planting material on growth and seed rhizome yield of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Kasetsart Journal**, v.31, p.445-451, 1997.

PEGG, K.G., MOFFETT, M.L., COLBRAN, R.C. Diseases of ginger in Queensland. **Queensland Agricultural Journal**. December, p.611-618, 1974.

PILLAI, S.K., KUMAR, K.B. Note on the clonal multiplication of ginger *in vitro*. **Indian Journal Agricultural Science**, v.52, n.6, p.397-9, 1982.

PILLAI, P.K.T., VIAJAYAGOPAL, G., NAMBIAR, M.C. Flowering behavior, cytology and pollen germination in ginger (*Zingiber officinale*). **Journal of Plant Crops**, v. 5, p.12-13, 1978.

ROUT, G.R., DAS, P. In vitro organogenesis in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**, v.4, n.4, p.41-51, 1997.

SAKAMURA, F., OGIHARA, K., SUGA, T. et al. Volatile constituents of *Zingiber officinale* rhizome produced by *in vitro* shoot tip culture. **Phytochemistry**, v.25, p.1333-1335, 1986.

SAKAMURA, F., SUGA, T. Biotechnology in agriculture and forestry. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1989, v.7, p.524-538.

SHARMA, T.R., SINGH, B.M., CHAUHAN, R.S. Production of disease free encapsulated bubs of *Zingiber officinale* Rosc. **Plant Cell Reports**, v.13, n.5, p.300-302, 1994.

SHARMA, T.R., SINGH, B.M. Simple and cost-effective medium for propagation of ginger (*Zingiber officinale*). **Indian Journal of Agricultural Science**, v.65, n.7, p.506-8, 1995.

TOMLINSON, P.B. Studies of the Systematic Anatomy of the Zingiberaceae. **Journal Linn. Society. Bot.**, v.60, p.547-92, 1956.

ZARATE, R., YEOMAN, M.M. Changes in the amounts of (6) gingerol and derivatives during a culture cycle of ginger, *Zingiber officinale*. **Plant Science**. v.121, p. 115-122, 1996.

2- ARTIGOS CIENTÍFICOS

2.1- DESENVOLVIMENTO *in vitro* DE GENGIBRE EM MEIO COM ANA E BAP

RESUMO

O trabalho avaliou combinações de ANA (0,67; 1,34; 2,69 μ M) e BAP (2,22; 4,44; 8,88 μ M) na multiplicação e desenvolvimento *in vitro* de plântulas de gengibre. As características avaliadas foram o número e o comprimento de brotações e raízes e peso de matéria fresca e seca das plântulas. Pelos resultados obtidos observou-se que a taxa de multiplicação foi baixa, sendo assim outros experimentos são necessários com combinações de auxina e citocinina, em níveis superiores aos do presente trabalho e com maior tempo de cultivo.

Palavras-Chaves: *Zingiber officinale*, micropropagação, ácido naftalenoacético (ANA), 6-Benzilaminopurina (BAP).

2.1.1- INTRODUÇÃO

O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), especiaria apreciada pelas suas características medicinais, aromáticas e condimentares, é consumida em diversas partes do mundo.

A micropropagação do gengibre têm sido proposta na multiplicação em larga escala devido aos problemas ocasionados pela contínua propagação vegetativa dos rizomas, como disseminação de infecções sistêmicas, diminuição do volume do produto comercializável e desuniformidade das plantas devido à dormência das gemas (HOSOKI e SAGAWA, 1977; BALACHANDRAN et al., 1990; IKEDA e TANABE, 1989; LANGE et al., 1987). É, portanto desejável o desenvolvimento de outro método de propagação, como alternativa à propagação vegetativa com rizomas. A micropropagação tem sido útil na produção em condições estéreis de grande número de plantas uniformes e geneticamente estáveis (EVANS, 1990).

A propagação de gengibre *in vitro* foi descrita anteriormente via gemas axilares (INDEN et al. 1988; ARIMURA et al., 2000), organogênese (ROUT e DAS, 1997) e embriogênese somática (KACKAR et al., 1993). Os reguladores de crescimento, auxina e citocinina, são normalmente adicionados ao meio de cultura, promovendo crescimento e o desenvolvimento organizado no tecido da planta (GASPAR et al., 1996).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da interação da auxina, ácido naftalenoacético (ANA) e da citocinina, benzilaminopurina (BAP) na multiplicação e desenvolvimento de plântulas de gengibre *in vitro*.

2.1.2- MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Teste de Progenies de Hortaliças do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa. As plântulas de gengibre *in vitro* foram obtidas de gemas de rizomas (ARIMURA et al., 2000). Os explantes iniciais consistiram de ápices caulinares destas plântulas de gengibre *in vitro*, cultivadas em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), medindo de 4-6 mm de comprimento. Os segmentos foram cultivados em meio MS suplementado com vitaminas (tiamina, piridoxina, ácido nicotínico e glicina), mio-inositol, 30 g/L de sacarose, ANA (0,67; 1,34; 2,69 μM) e BAP (2,22; 4,44; 8,88 μM). O meio de cultura foi gelificado com ágar a 0,7%, pH 5,8, em frascos tipo Magenta® e autoclavados à 121°C por 20 minutos. Foram cultivados 4 explantes por frasco, sendo 3 frascos por tratamento, no delineamento inteiramente casualizado. Os tratamentos foram as combinações de ANA e BAP (0,67 e 2,22; 0,67 e 4,44; 0,67 e 8,88; 1,34 e 2,22; 1,34 e 4,44; 1,34 e 8,88; 2,69 e 2,22; 2,69 e 4,44 e 2,69 e 8,88 μM), respectivamente. O experimento foi mantido em sala de crescimento, com 14 horas de luz, irradiância de 32,65 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de 25°C. Avaliou-se, após 30 dias, o número e comprimento de brotações, número e comprimento de raízes, assim como o peso de matéria

fresca e seca das plântulas formadas. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.1.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

As avaliações foram realizadas em todos os tratamentos após 30 dias de cultivo. Pela análise de variância observou-se que houve efeito significativo de tratamentos no comprimento médio de brotações, número médio de raízes, peso de matéria fresca e seca a 1% de probabilidade pelo teste F (Tabela 1).

Tabela 1- Resumo da análise de variância para número médio de brotações, comprimento médio de brotações, número médio de raízes, comprimento médio de raízes, peso médio de matéria fresca e seca em função de combinações de ANA e BAP (0,67 e 2,22; 0,67 e 4,44; 0,67 e 8,88; 1,34 e 2,22; 1,34 e 4,44; 1,34 e 8,88; 2,69 e 2,22; 2,69 e 4,44 e 2,69 e 8,88 μM), respectivamente.

Fontes de Variação	Quadrado Médio
Número médio de brotações	0.92593 ^{n.s.}
Comprimento médio de brotações	1.88799 **
Número médio de raízes	42.02316 **
Comprimento médio de raízes	0.93224 ^{n.s.}
Peso médio de matéria fresca	0.07833 **
Peso médio de matéria seca	0.00054 **

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

^{n.s.} Não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, o maior comprimento médio de brotações (2,81 cm) foi observado no tratamento com a combinação 0,67 μM de ANA e 4,44 μM de BAP (Tabela 2), sem diferença significativa com os

demaís tratamentos, exceto no tratamento com os níveis mais elevados de ANA e BAP (2,69 e 8,88 μM , respectivamente) que apresentou o menor comprimento médio de brotações (1,51 cm). INDEN et al. (1988) em cultivo *in vitro* de gengibre obtiveram maior comprimento de brotações (1,42 cm) em meio MS contendo combinações de ANA e BAP (2,69 e 22,2 μM , respectivamente), utilizando níveis de BAP superiores aos do presente trabalho, além do maior período de cultivo (60 dias). Comparando os resultados observados neste experimento e no trabalho de INDEN et al. (1988), níveis elevados de BAP causaram redução do crescimento das plântulas de gengibre.

Tabela 2- Comprimento médio de brotações de gengibre *in vitro* após 30 dias cultivo, em meio de cultura com ANA e BAP.

ANA (mM)	0,67	1,34	2,69
BAP (mM)			
2,22	2,38 a A	2,39 a A	2,55 a A
4,44	2,81 a A	1,90 b A	2,59 a A
8,88	2,18 ab A	2,50 a A	1,51 b B

As médias representadas pela mesma letra minúscula (dentro de um nível de BAP) e pela mesma letra maiúscula (dentro de um nível de ANA) não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

No presente experimento, as plantas brotaram e enraizaram no mesmo meio de cultura não necessitando de transferência ao meio específico de enraizamento. PALAI et al. (1997) induziram a formação de brotos de

gingibre em meio contendo BAP e ácido indolacético e o enraizamento foi realizado com a individualização das plântulas e transferência ao meio contendo ácido indolbutírico ou ácido indolacético.

Com relação ao enraizamento, o maior número médio de raízes foi obtido na combinação 2,22 μ M de BAP com 2,69 μ M de ANA (Tabela 3), ou seja, no meio de cultura com maior nível de ANA e menor nível de BAP. O número de raízes foi crescente com níveis de ANA e decrescente com o aumento dos níveis de BAP, o mesmo foi observado por BHAGYALAKSHMI e SINGH (1988).

Tabela 3- Número médio de raízes de plântulas gengibre *in vitro* após 30 dias cultivo, em meio de cultura com ANA e BAP.

ANA (mM)	0,67	1,34	2,69
BAP (mM)			
2,22	7,5 a A	9,17 a A	9,58 a A
4,44	5,83 a A	5,58 a B	8,17 a A
8,88	4,58 a A	5,92 a AB	4,75 a B

As médias representadas pela mesma letra minúscula (dentro de um nível de BAP) e pela mesma letra maiúscula (dentro de um nível de ANA) não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4- Peso médio de matéria fresca de plântulas de gengibre *in vitro* após 30 dias cultivo, em meio de cultura com ANA e BAP.

ANA (mM)	0,67	1,34	2,69
BAP (mM)			
2,22	0,312 a A	0,378 a A	0,371 a AB
4,44	0,440 a A	0,184 b B	0,409 a A
8,88	0,321 a A	0,339 a A	0,240 a B

As médias representadas pela mesma letra minúscula (dentro de um nível de BAP) e pela mesma letra maiúscula (dentro de um nível de ANA) não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 5- Peso médio de matéria seca de plântulas de gengibre *in vitro* após 30 dias cultivo, em meio de cultura com ANA e BAP.

ANA (mM)	0,67	1,34	2,69
BAP (mM)			
2,22	0,033 a A	0,036 a A	0,031 a AB
4,44	0,038 a A	0,019 b B	0,039 a A
8,88	0,030 a A	0,032 a A	0,022 a B

As médias representadas pela mesma letra minúscula (dentro de um nível de BAP) e pela mesma letra maiúscula (dentro de um nível de ANA) não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

O peso de matérias fresca e seca total das plantas não diferiu significativamente entre os tratamentos, exceto na combinação 1,34 μM de ANA com 4,44 μM de BAP que apresentou menor peso de matéria fresca e seca (Tabela 4 e 5, respectivamente).

A taxa de multiplicação foi baixa, sendo assim outros experimentos são necessários com combinações de citocinina e auxina, em níveis superiores aos níveis utilizados no presente trabalho e com maior tempo de cultivo das plântulas, realizando-se subcultivos periodicamente.

2.1.4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIMURA, C.T., FINGER, F.L., CASALI. V.W.D. A fast method for in vitro propagation of ginger. **Tropical Science**, v.40, p.86-91, 2000.

BALACHANDRAN, S.M., BHAT, S.R., CHANDEL, K.P.S. In vitro clonal multiplication of turmeric (*Curcuma* spp.) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). **Plant Cell Reports**, v.8, p.521-524, 1990.

BHAGYALAKSHMI; SINGH, N.S. Meristem culture and micropropagation of a variety of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) with a high yield of oleoresin. **Journal of Horticultural Science**, v.63, n.2, p.321-237, 1988.

EVANS, N.E. **Micropropagation**. Methods in molecular biology. Plant cell and tissue culture (Jeffrey W. Pollard e John M. Walker). New Jersey: Humana Press. Clifton,. 93-103. 1990.

GASPAR, T.; KEVERS, C.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; REID, D. M. THORPE, T. A. Plant Hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In vitro Cell Development Biology Plant**, v.32, p.272-289, 1996.

HOSOKI, T.; SAGAWA, Y. Clonal propagation of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) through tissue culture. **HortScience**, v.12, n.5, p.451-452, 1977.

IKEDA, L.R., TANABE, M.J. In vitro subculture applications for ginger. **HortScience**, v.24, n.1, p.142-143, 1989.

INDEN, H.; ASAHIRA, T. Micropropagation of ginger. **Acta Horticulturae**, v.230, p.177-184, 1988.

KACKAR, A.; BHAT, S.R.; CHANDEL, K.P.S.; MALIK, S.K. Plant regeneration via somatic embryogenesis in ginger. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.32, p.289-292, 1993.

LANGE, J.H., WILLERS, P., NEL, M. Elimination of nematodes from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) by tissue culture. **Journal of Horticultural Science**, v.62, n.2, p.249-252, 1987.

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

PALAI, S.K.; ROUT, G.R.; DAS, P. Micropropagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) interaction of growth regulators and culture conditions. **Biotechnology of spices, medicinal & aromatic plants**. Proceedings of the national seminar on biotechnology of spices and aromatic plants, India, p.20-24. 1997.

ROUT, G.R.; DAS, P. In vitro organogenesis in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**, v.4, n.4, p.41-51, 1997.

2.2- Efeito de BAP e CIN no cultivo *in vitro* de gengibre

2.2.1- INTRODUÇÃO

O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) monocotiledônea perene, é conhecida e cultivada mundialmente. No cultivo do gengibre os rizomas são os produtos de interesse econômico, dos quais se extraem óleos essenciais e oleorresinas utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica e de perfumaria. A planta é propagada vegetativamente por fragmentos de rizomas, denominados “rizoma-semente”, contendo 3 a 4 gemas. A propagação vegetativa pode ocasionar redução de produção e qualidade dos rizomas devido à incidência de infecções sistêmicas como a podridão causada por fungos (*Fusarium oxysporum*, *Pythium aphanidermatum*, *P. butleri*, *P. gracile*, *P. myriotylum* e *P. nigritilum*), nematóides (*Meloidogyne* spp.) e murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), que são transmitidas por meio dos propágulos contaminados (SHARMA e SINGH, 1995).

DOHROO (1989) relatou que aproximadamente 87% das infecções com *Fusarium oxysporum* são transmitidas por rizomas contaminados. HOSOKI e SAGAWA (1977) estimaram que a produção do gengibre poderia ser triplicada apenas com o controle das infecções sistêmicas. Na atual preocupação com a qualidade de vida, busca-se principalmente o consumo de produtos mais saudáveis, por isso as práticas de controle químico estão sendo reduzidas ou evitadas. Isto poderia ocasionar depreciação na qualidade final dos rizomas, devido a possíveis alterações na composição dos compostos pungentes, além da presença de resíduos tóxicos nos rizomas.

Visando minimizar este problema a alternativa seria a utilização de órgãos propagativos obtidos pela cultura de tecidos. A regeneração de plantas de gengibre pela cultura de tecidos foi descrita em várias formas: pela cultura de gemas axilares (INDEN *et al.*, 1988), pela cultura de meristemas (BHAGYALAKSHMI e SINGH, 1988), via organogênese (ROUT e DAS, 1997), via embriogênese somática (KACKAR *et al.*, 1993) e via segmentos nodais estiolados (ARIMURA *et al.*, 2000), permitindo a limpeza clonal além de proporcionar a obtenção de grande número de plantas idênticas (DE LANGE *et al.*, 1987).

O regulador de crescimento, citocinina, adicionado ao meio de cultura na dose apropriada, tem a destacada função de promover a formação de brotações adventícias (GEORGE, 1993). Com isso, a adição ao meio de cultura aumenta a taxa de multiplicação das brotações, tornando o método de micropropagação de gemas mais eficiente. As citocininas comumente utilizadas na cultura *in vitro* do gengibre são a Benzilaminopurina (IKEDA e TANABE, 1989; BHAGYALAKSHMI e SINGH, 1988; LANGE *et al.*, 1987; INDEN *et al.*, 1988) e a Cinetina (SHARMA *et al.*, 1994; SHARMA e SINGH, 1995; BHAGYALAKSHMI e SINGH, 1988).

Nos trabalhos de multiplicação *in vitro* acima citados, os autores verificaram o efeito da citocinina durante um período de cultivo de quatro a sete semanas, não realizando os subcultivos durante este período. O tempo de cultivo dos explantes e as renovações periódicas do meio de cultura são fatores que podem também influenciar a taxa de multiplicação das brotações, pois alteram diretamente a concentração do regulador de crescimento e de nutrientes no meio de cultura.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de níveis das citocininas BAP (benzilaminopurina) e CIN (Cinetina) na multiplicação de gemas axilares de gengibre cultivadas *in vitro*.

2.2.2- MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos II da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília - DF. As plântulas de gengibre *in vitro* foram obtidas de gemas de rizomas (ARIMURA et al., 2000). Os explantes iniciais consistiram de ápices caulinares destas plântulas de gengibre *in vitro*, cultivadas em meio MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), medindo de 4-6 mm de comprimento. Os explantes foram cultivados em meio MS com 3% de sacarose, 0,2% de Phytigel (Sigma), pH 5,8, suplementado com BAP ou CIN (0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 μ M), em frascos tipo Magenta® e autoclavados à 121°C por 20 minutos. Foram utilizadas 8 repetições por tratamento, sendo 4 frascos contendo dois explantes cada. O experimento foi mantido em sala de crescimento, com fotoperíodo de 14 horas e temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Avaliou-se aos 30, 60 e 90 dias o número de brotações e de raízes desenvolvidas. Na primeira e segunda avaliações, realizou-se a transferência das brotações ao meio de cultura fresco contendo o mesmo nível de citocinina, sem a separação das plântulas desenvolvidas. O experimento foi arranjado em delineamento inteiramente casualizados e os dados submetidos à análise de regressão a 5% de probabilidade.

2.2.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.3.1- Número de brotações:

O número médio de brotações aos 30, 60 e 90 dias nos meios com BAP e CIN constam das Figuras 1 e 2, respectivamente, e o resultado da análise de variância do Quadro 1.

Na primeira avaliação aos 30 dias, o número de brotações foi baixo e praticamente constante em todos os meios, tanto com BAP como CIN. Pela análise de variância verificou-se o efeito de BAP, a 1% de significância. O número médio de brotos nos tratamentos BAP e CIN foi 2,2 e 3,3 brotos/explante, respectivamente. Provavelmente o período de 30 dias de cultivo foi insuficiente na avaliação do efeito de BAP e CIN e concentração de citocinina quanto ao número de brotos formados.

BHAGYALAKSHMI e SINGH (1988) cultivaram gemas de gengibre da variedade Wynad local *in vitro* e verificaram que a cinetina, quando adicionada em pequenas concentrações (0,5 μ M), não aumentava a taxa de multiplicação das brotações quando comparadas ao controle, porém quando utilizada em grandes concentrações (2,0 μ M) inibia a formação de brotações. No presente experimento, mesmo com níveis bem acima dos utilizados por BHAGYALAKSHMI e SINGH (1988), não foram observadas inibições na formação de brotações nos explantes.

O efeito significativo dos meios com BAP causou aos 60 dias de cultivo crescimento linear do número de brotações/explante com o aumento do nível de BAP (Figura 3). Os meios com CIN não causaram efeito significativo no número de brotações até os 60 dias de cultivo.

Na última avaliação, aos 90 dias de cultivo, houve efeito significativo dos meios com BAP, quanto ao número de brotações/explante. Houve resposta quadrática e a resposta máxima da taxa de multiplicação das brotações, ou seja, 9,9 brotos/explante, foi com 6,2 μ M de BAP (Figura 4).

2.2.3.2- Número de raízes:

O número médio de raízes observado aos 30, 60 e 90 dias nos meios com BAP e CIN constam das Figuras 5 e 6, respectivamente, e o resultado da análise de variância no Quadro 1. Observa-se que o enraizamento ocorreu em todos os meios, independente da presença ou ausência da citocinina.

O efeito significativo do BAP no enraizamento dos explantes foi observado aos 30, 60 e 90 dias. Aos 30 dias houve resposta linear decrescente do número de raízes com o aumento da concentração de BAP havendo maior formação de raízes na ausência do BAP (Figura 7). Resultados semelhantes foram encontrados por BHAGYALAKSHMI e SINGH (1988) em cultivo de gemas axilares de gengibre em meio de cultura contendo 0,2 e 1,0 mg/L de BAP, onde obtiveram a formação média de 3,1 e 0,7 raízes/explante, respectivamente.

Aos 60 dias houve aumento do número de raízes, principalmente entre os níveis 5,0 e 7,5 μ M de BAP. Na taxa de enraizamento aos 90 dias houve resposta quadrática, atingindo o ponto máximo 24,3 raízes/explante, com 5,37 μ M de BAP (Figura 8).

Nos meios com CIN houve efeito significativo somente aos 30 dias de cultivo, sendo que o número de raízes foi praticamente constante em todos os níveis.

Os resultados de enraizamento mostram que na multiplicação *in vitro* de gengibre, não seria necessário ao enraizamento à adição de regulador de crescimento, pois mesmo na sua ausência houve boa formação do sistema radicular, comportamento semelhante foi observado por IKEDA e TANABE (1989) que utilizaram BAP (0 a 44 μ M) em combinação com ANA (ácido naftaleno acético) e não verificaram efeito no enraizamento durante sete semanas de cultivo.

O excesso de citocinina no meio de cultura pode ocasionar toxidez aos explantes. Segundo GRATTAPAGLIA e MACHADO (1990), os sintomas de toxidez de citocinina são; excessivo entumescimento, falta de alongamento das culturas, redução nas dimensões das folhas, encurtamento dos entrenós, engrossamento excessivo dos caules e vitrificação generalizada da cultura. Neste experimento, não ocorreram estes sintomas de toxidez nos explantes em nenhum dos meios, mesmo após os 90 dias de cultivo com subcultivos mensais.

Quadro 1: Quadrados médios das variáveis número de brotações e número de raízes de gengibre aos 30, 60 e 90 dias de cultivo em função de níveis de BAP e CIN (0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 μ M)

	Quadrado médio			
	Número de brotações		Número de raízes	
	BAP	CIN	BAP	CIN
30 dias	0,2875 **	1,4125 ns	31,8500**	1,9375**
60 dias	18,5375 +	4,2125 ns	111,3125**	104,3125 ns
90 dias	11,7125 +	30,0250 +	127,8500 +	45,0375 ns

** significativo a 1% de probabilidade; * significativo a 5% de probabilidade, + significativo a 10% de probabilidade e n.s. não significativo.

2.2.4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIMURA, C.T., FINGER, F.L., CASALI, V.W.D. A fast method for in vitro propagation of ginger. **Tropical Science**, v.40, p.86-91, 2000.

BHAGYALAKSHMI, SINGH, N.S. Meristem culture and micropropagation of a variety of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) with a high yield of oleoresin. **Journal of Horticultural Science**, v.63, n.2, p.321-327, 1988.

DE LANGE, J.H., WILLER, P., NEL, M. Elimination of nematodes from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) by tissue culture. **Journal Horticultural Science**, v.62, p.249-252, 1987.

DOHROO, N.P. Seeds transmission of pre-emergence rot and yellows in ginger. **Plant Disease Research**, v.4, p.73-74, 1989.

GEORGE, E. **Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology**. 2nd. Edition, 1993. 574 p.

HOSOKI, T., SAGAWA, Y. Clonal propagation of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) through tissue culture. **HortScience**, v.12, p.451-452, 1977.

IKEDA, L.R., TANABE, M.J. In vitro subculture applications for ginger. **HortScience**, v.24, n.1, p.142-143, 1989.

INDEN, H., ASAHIRA, T. Micropropagation of ginger. **Acta Horticulturae**, v.280, p.177-184, 1988.

KACKAR, A., BHAT, S.R., CHANDEL, K.P.S., MALIK, S.K. Plant regeneration via somatic embryogenesis in ginger. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.32, p.289-292, 1993.

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

ROUT, G.R., DAS, P. In vitro organogenesis in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**, v.4, n.4, p.41-51, 1997.

SHARMA, T.R., SINGH, B.M. Simple and cost-effective medium for propagation of ginger (*Zingiber officinale*). **Indian Journal of Agricultural Science**, v.65, n.7, p.506-8, 1985.

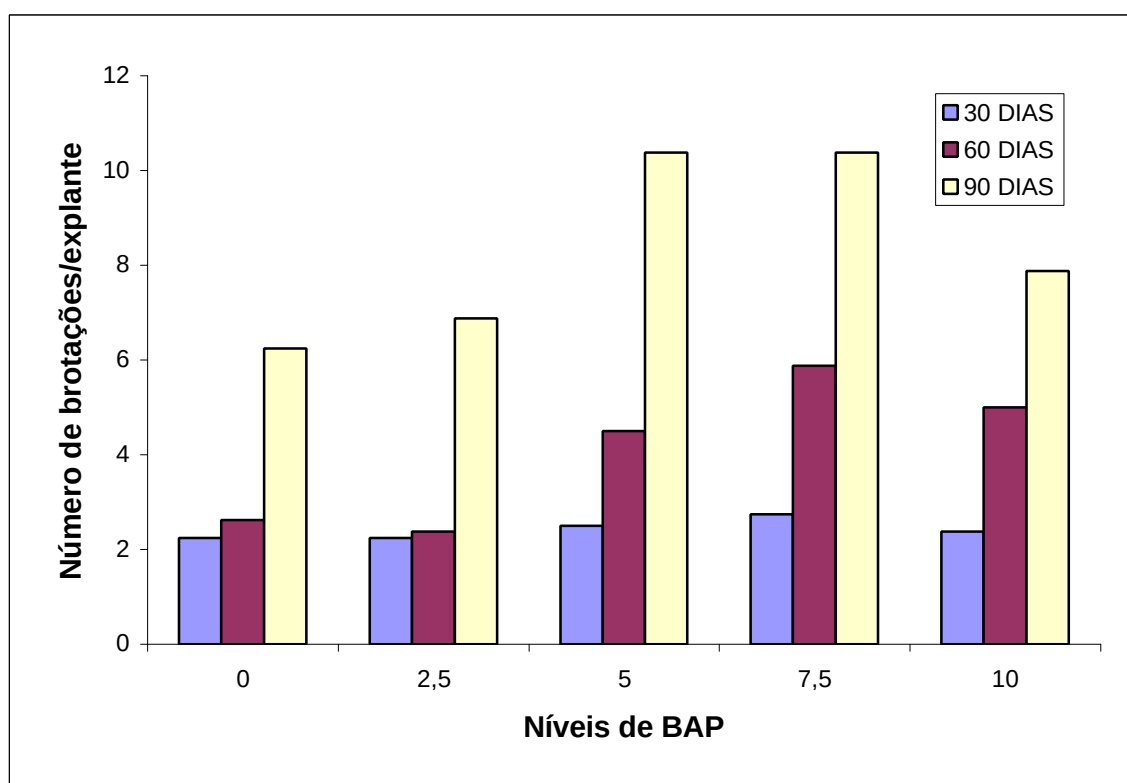


Figura 1- Número médio de brotações de gengibre micropropagados em função de níveis de BAP (μM) aos 30, 60 e 90 dias de cultivo.

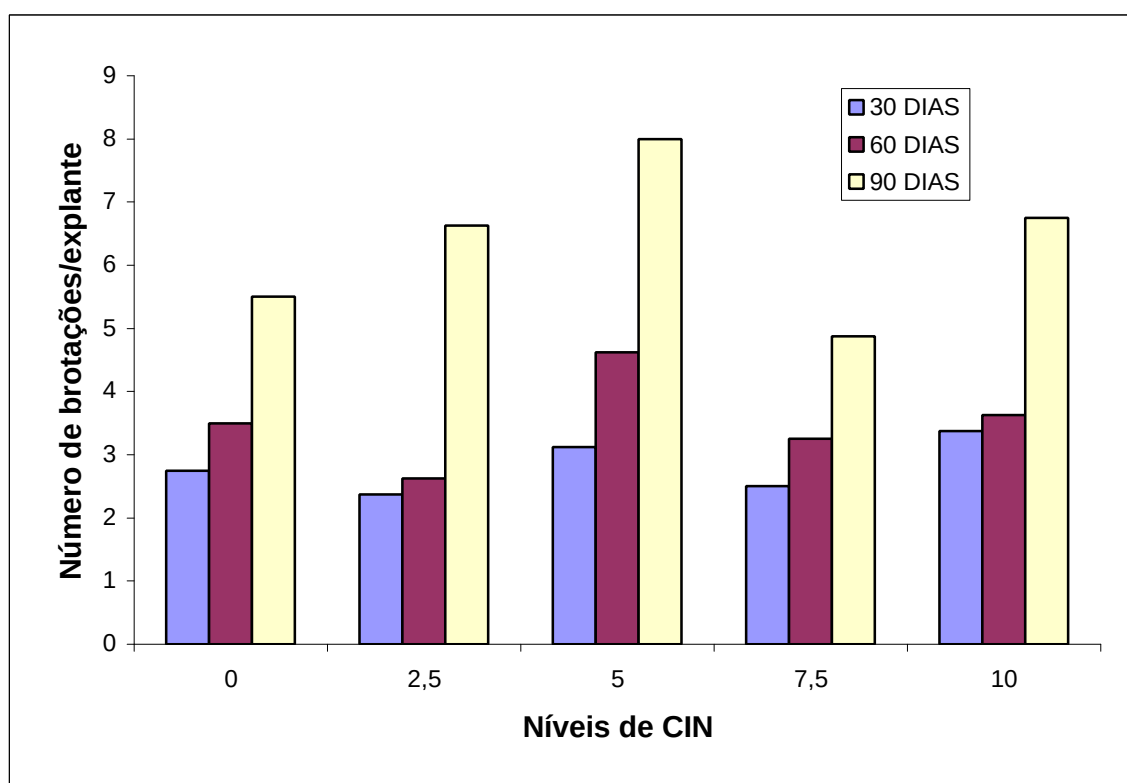


Figura 2- Número médio de brotações de gengibre micropropagados em função de níveis de CIN (μM) aos 30, 60 e 90 dias de cultivo.

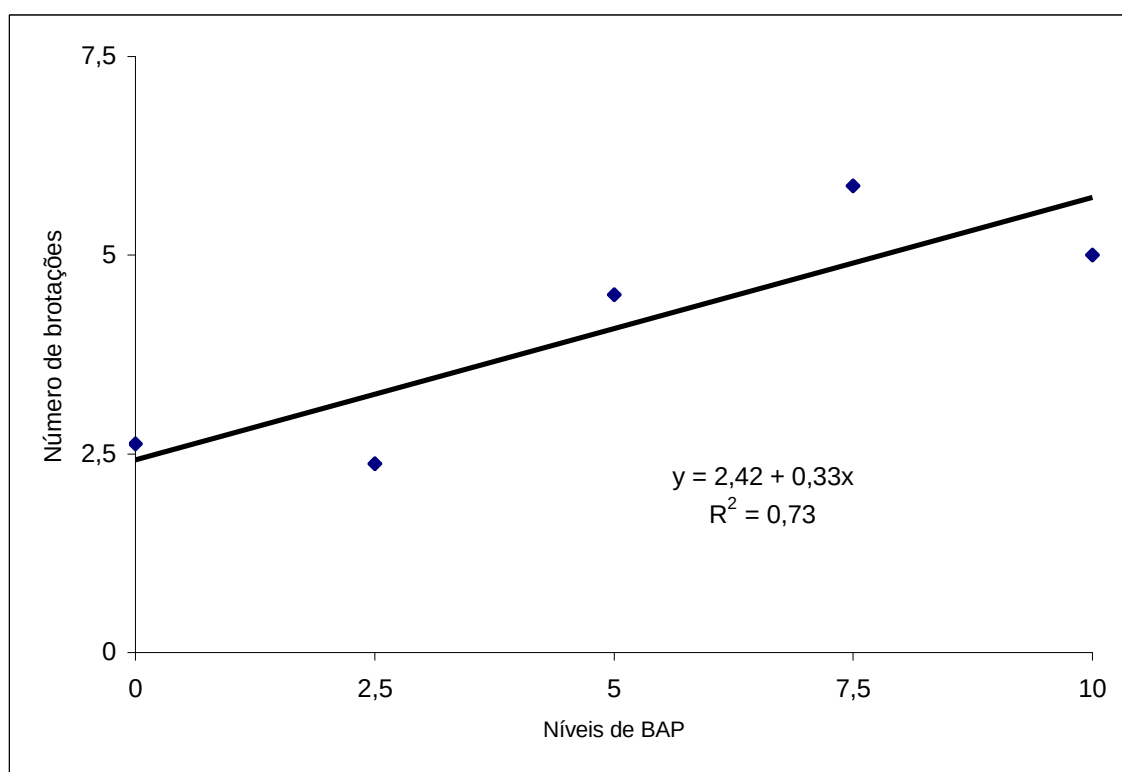


Figura 3- Estimativa do número médio de brotações em explantes de gengibre cultivados por 60 dias em meio de cultura contendo níveis de BAP (μM).

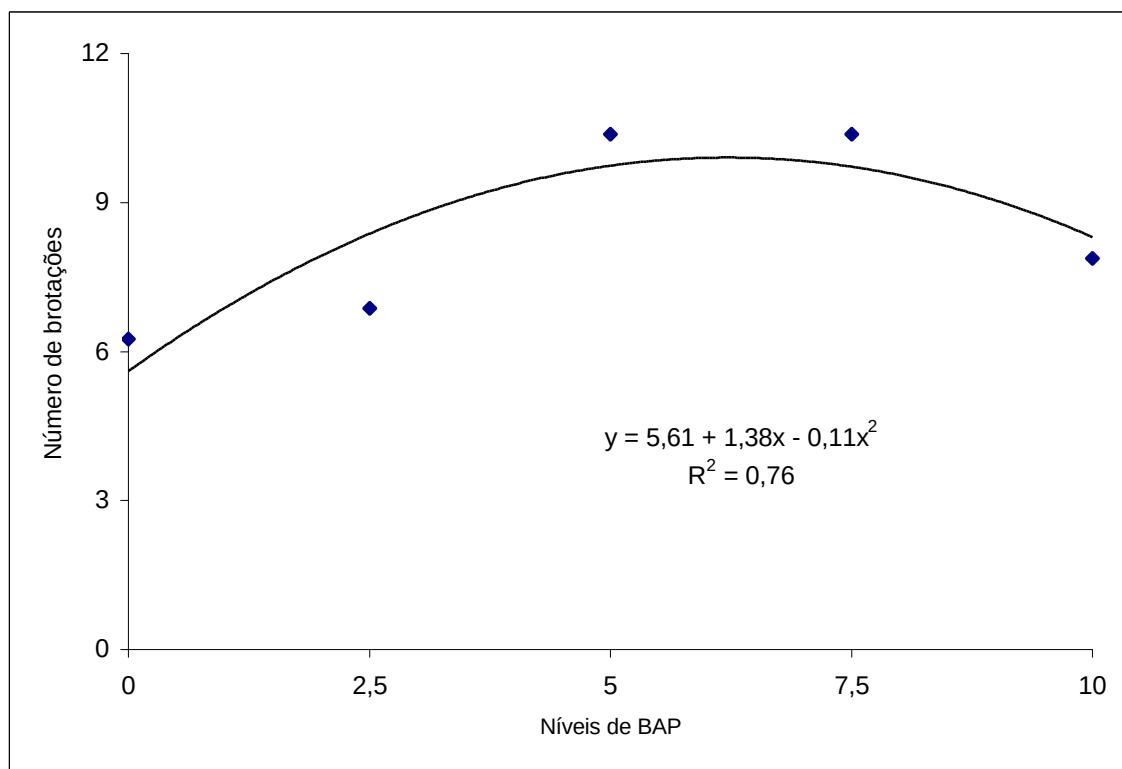


Figura 4- Estimativa do número médio de brotações de explantes de gengibre micropropagado em função de níveis de BAP (μM) após 90 dias de cultivo.

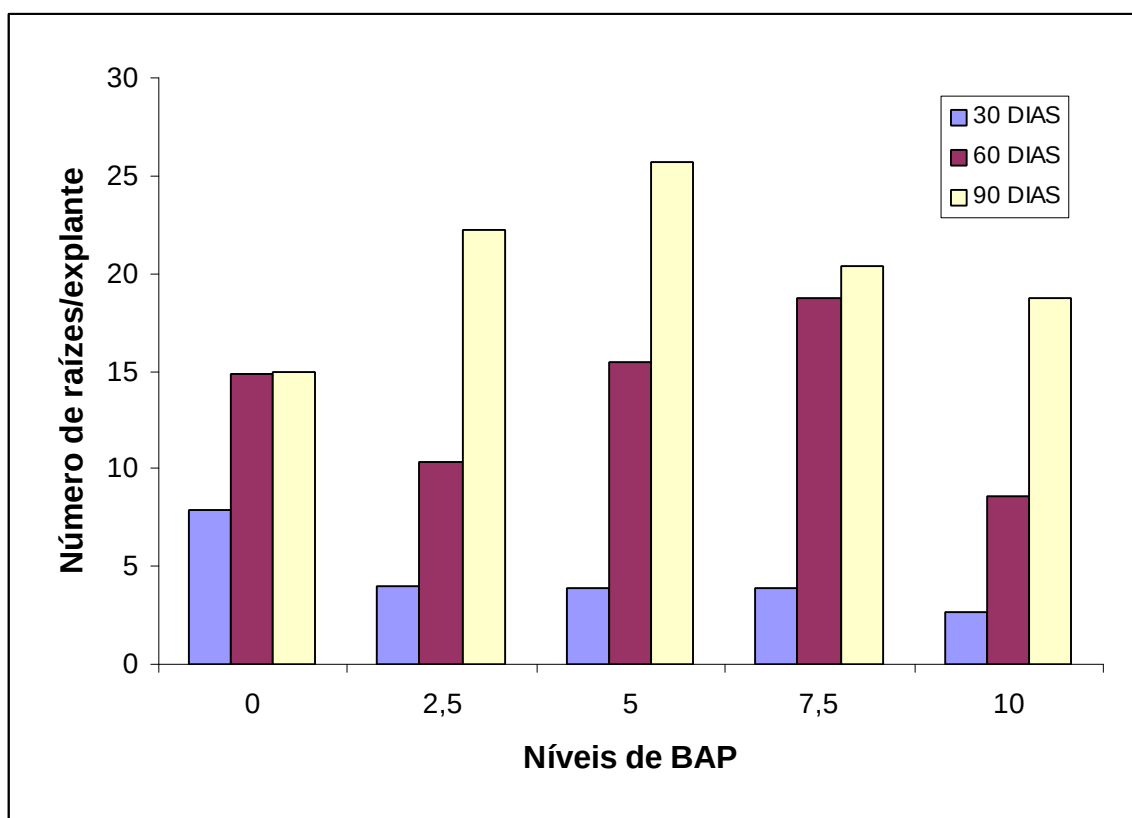


Figura 5- Número médio de raízes de gengibre micropropagados por explante em função de níveis de BAP (μM) aos 30, 60 e 90 dias de cultivo.

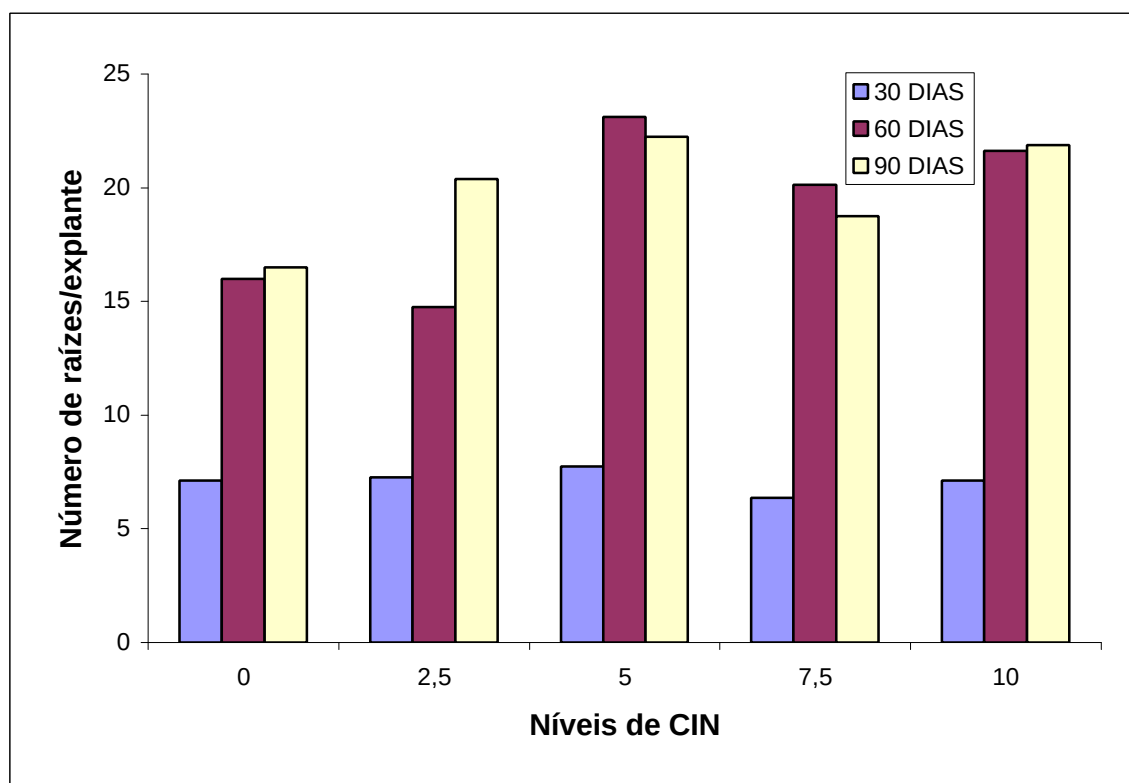


Figura 6- Número médio de raízes de gengibre micropropagados por explante em função de níveis de CIN (μM) aos 30, 60 e 90 dias de cultivo.

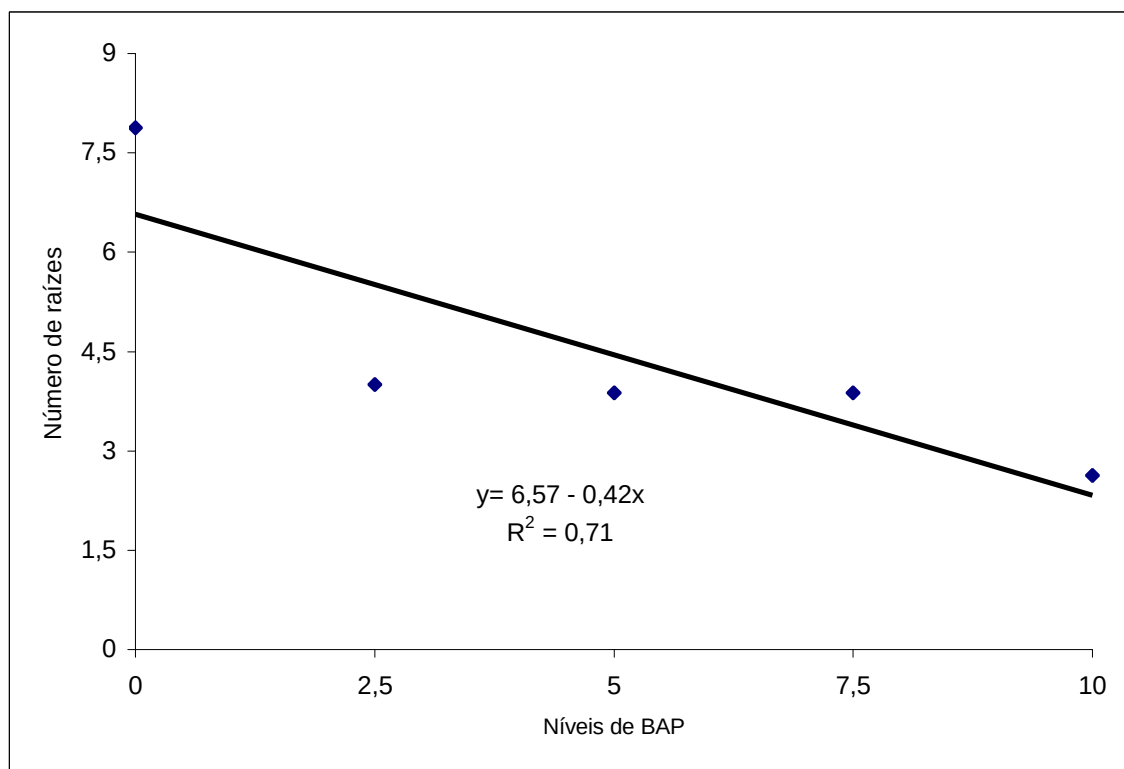


Figura 7- Estimativa do número médio de raízes de explantes de gengibre micropropagado em função de níveis de BAP (μM) após 30 dias de cultivo.

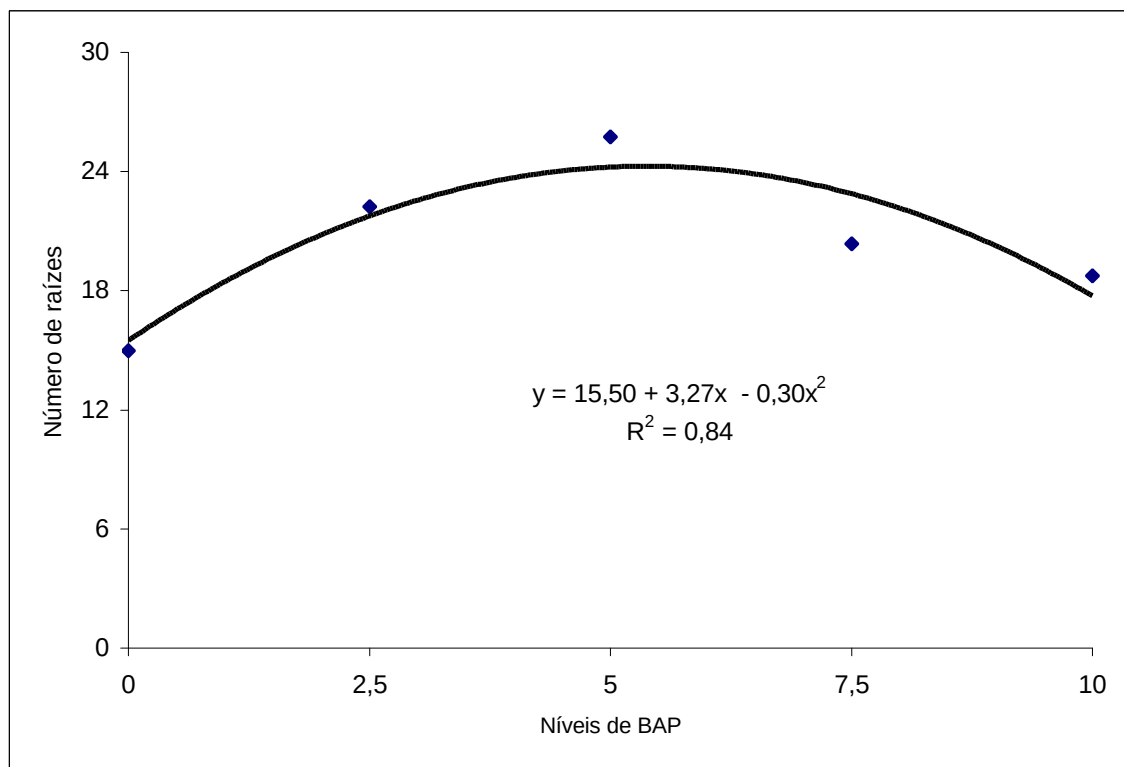


Figura 8- Estimativa do número médio de raízes de explantes de gengibre micropropagado em função de níveis de BAP (μM) após 90 dias de cultivo.

2.3- EMBRIOGÊNESE SOMÁTICA E REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE GENGIBRE

2.3.1- INTRODUÇÃO

O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) apesar de ser planta tropical, é cultivada e consumida em diferentes regiões do mundo, devido à grande versatilidade como alimento, especiaria, condimento e medicamento. No Brasil há condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento desta cultura com excelente potencial de exportação e expansão das áreas cultivadas, apesar de 92,7% da produção se concentrar apenas nos Estados de São Paulo e Paraná (IBGE, 2001). Um dos maiores problemas no cultivo do gengibre é a obtenção de grande quantidade de “rizoma-semente” livre de doenças, visto que sua propagação é exclusivamente vegetativa.

Pelas razões expostas, a cultura de tecidos em gengibre tem sido intensivamente estudada com os seguintes propósitos: limpeza clonal (DE LANGE et al., 1987; SHARMA et al., 1994), produção de metabólitos secundários (SAKAMURA et al., 1986; ZARATE e YEOMAN, 1996) e micropropagação, pela multibrotação de gemas (PALAI et al., 1997; SHARMA e SINGH, 1995), por segmentos nodais estiolados (ARIMURA et al., 2000), pela organogênese (ROUT e DAS, 1997; BABU et al., 1992) e via embriogênese somática (KACKAR et al., 1993; BABU et al., 1996; MALAMUG et al., 1991).

Além da obtenção de matrizes de propagação em grande número, existe também a necessidade de obtenção de novas cultivares resistentes às doenças que causam grandes perdas na cultura. Dentre as técnicas biotecnológicas, a

transformação genética seria a alternativa de grande potencial no melhoramento genético do gengibre, permitindo assim a incorporação de novas características em cultivares já existentes. Mas isto só será possível com a utilização de métodos eficientes de seleção e regeneração de plantas por meio da cultura de tecidos ou células após a transferência do gene de interesse.

A regeneração de plantas via embriogênese somática é preferida em relação à via organogênica, pois normalmente o embrião somático surge de uma única célula (VASIL, 1988) e, assim, a manipulação genética pode ser realizada diretamente em gerações subsequentes.

A embriogênese somática pode ocorrer de duas formas: embriogênese somática direta e indireta. A diferença entre as duas formas de embriogênese é que na primeira ocorre a formação dos embriões somáticos diretamente do explante e, na Segunda, ocorre a formação de calos que posteriormente se diferenciam em embriões somáticos (GEORGE, 1993). Pode ocorrer a formação de dois tipos de calos embriogênicos na embriogênese somática indireta: os calos embriogênicos denominados Tipo I, que são compactos, organizados e com coloração branca, ou os calos embriogênicos Tipo II, que são calos friáveis, uniformes, de coloração amarelada. A transformação dos calos do Tipo I em calos do Tipo II ou vice-versa pode ocorrer quando o período de subcultivo é prolongado ou a composição do meio é alterada (VASIL et al., 1984). Os calos embriogênicos do Tipo II mantêm a habilidade de regenerar plantas a qualquer momento, devido à sua natureza friável, além disso, permitem o estabelecimento de suspensão celular e cultura de protoplasto e são preferidos em alguns tipos de manipulação *in vitro*. O calo Tipo II tende a se formar em

menor frequência que o calo Tipo I, além de ser obtido em poucos genótipos (CARVALHO et al., 1997).

No presente trabalho foi desenvolvido o protocolo de regeneração de plantas de gengibre via embriogênese somática, caracterizando as fases de indução e diferenciação de calos e germinação dos embriões somáticos.

2.3.2- MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos II da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, em Brasília - DF. Os rizomas de gengibre foram obtidos no Banco de Germoplasma de Hortaliças do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa. Gemas retiradas dos rizomas foram estabelecidas *in vitro* em meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) de acordo com ARIMURA et al. (2000). As plantas desenvolvidas foram subcultivadas a cada trinta dias e suas folhas utilizadas como explante inicial na indução de calos.

2.3.2.1- Fase de indução de calos

Na indução de calos embriogênicos foram utilizados os explantes foliares retirados do limbo e bainha (Figura 1), medindo aproximadamente 5 mm de comprimento. Os explantes foram cultivados em meio MS, suplementado com 3% de sacarose, 0,2% de Phytigel (Sigma) e níveis de 2,4-D, ANA e Dicamba nas concentrações de 0,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 μM , com 60 repetições por tratamento, sendo seis placas de Petri com 10 explantes em cada placa.

As placas de Petri foram mantidas na ausência de luz, à temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ em câmara de crescimento do tipo BOD. A cada quatro semanas, os calos foram avaliados e os explantes foram subcultivados no mesmo meio de cultura, realizando-se também a seleção dos calos primários e embriogênicos Tipo I e Tipo II, que foram subcultivados separadamente.

2.3.2.2- Fase de diferenciação dos calos embriogênicos

Com o objetivo de promover a diferenciação em embriões somáticos, os calos embriogênicos foram transferidos ao meio MS suplementado com concentrações de sacarose ou maltose (3,0; 4,5 e 6,0%) e 0,2% de Phytigel, em placas de Petri. Testou-se nesta fase o fotoperíodo de 16 horas (irradiância $32,65 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e a ausência de luz, ambos em temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, em câmara de crescimento do tipo BOD. Foram utilizadas duas placas por tratamento, com quatro agregados de calos embriogênicos por placa, sendo, portanto, 8 repetições por tratamento.

2.3.2.3- Fase de germinação dos embriões somáticos e desenvolvimento das plântulas

A germinação dos embriões somáticos foi realizada cultivando-se os embriões nos meios: MS básico, MS com 50% da concentração dos sais, MS básico com 0,2% de carvão ativado e MS com 50% da concentração dos sais mais 0,2% de carvão ativado. Todos os meios foram suplementados com 3% de sacarose, 0,2% de Phytigel e o pH ajustado para 5,8. Os embriões foram

colocados sobre o meio de cultura em Magenta®, mantidos em sala de crescimento, com de 16 horas luz, irradiância de $32,65 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Foram utilizadas 6 Magentas por tratamento contendo cinco agregados de embriões somáticos em cada. Os embriões germinados foram transferidos ao tubo de ensaio contendo meio MS, suplementado com 3% de sacarose e 0,2% de Fitagel nas mesmas condições da fase de germinação.

2.3.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.3.1- Fase de indução de calos

Não houve formação de calos a partir do explante proveniente de limbo foliar, em nenhum dos meios. Nos tecidos provenientes da bainha foliar, inicialmente ocorreu entumescimento do explante em todos os meios, seguido do calejamento nas regiões do corte nos tratamentos com 2,4-D (Figura 2) e nos demais meios ocorreu apenas à formação de raízes (Tabela 1). TEIXEIRA et al. (1993) também verificaram entumescimento dos embriões zigóticos imaturos de dendê após uma semana de cultivo em meio de indução de calos, que consistia do meio Y3 modificado, suplementado com $500 \mu\text{M}$ de 2,4-D e a formação dos calos ocorreu nas regiões vasculares do tecido.

Segundo SHYAMALA e SMITH (1990) em monocotiledôneas, explantes que contêm células meristemáticas e imaturas desenvolvem calos que expressam a totipotencialidade. Estas células podem estar presentes em

tecidos como ápices meristemáticos, bases foliares jovens, inflorescência imatura, embriões imaturos, tecidos nodais e anteras.

Em testes preliminares, a citocinina foi adicionada em combinação com a auxina visando indução de calos embriogênicos, entretanto não foi observado resultado promissor na presença de citocinina. A sensibilidade do tecido ao regulador de crescimento é provavelmente determinada pelo nível endógeno dos hormônios presentes nas células. A razão pela qual a citocinina não é necessária na indução de calos em algumas monocotiledôneas, como no presente experimento, é devido ao nível endógeno suficiente de citocinina presente no tecido (INOUE et al. 1979).

Nos tratamentos contendo ANA e Dicamba, foram realizados apenas dois subcultivos e avaliações aos 30 e 60 dias de cultivo, devido à ausência de calos (Tabela 1). Resultados contrários a esses foram obtidos por KACKAR et al. (1993), que testaram auxinas em segmentos foliares jovens de gengibre “Eruttupetta” e concluíram que, dentre as auxinas testadas, o meio contendo 2,7 μM Dicamba foi o mais efetivo na indução e manutenção de calos embriogênicos de gengibre a partir de segmentos foliares.

Tabela 1- Frequência da formação de calos e raízes em bainha foliar de gengibre cultivado em meio MS, contendo níveis das auxinas (ANA, Dicamba e 2,4-D), após 60 dias de cultivo.

Auxina	Níveis (μ M)	% explantes com calos	% explantes com raiz
ANA	0,0	0	0
	2,5	0	20
	5,0	0	15
	7,5	0	20
	10,0	0	45
Dicamba	0,0	0	0
	2,5	0	0
	5,0	0	5
	7,5	0	5
	10,0	0	10
2,4-D	0,0	0	0
	2,5	100	60
	5,0	100	0
	7,5	100	15
	10,0	85	5

Nos meios contendo 2,4-D iniciou-se aproximadamente após 10 dias a formação de calos denominados primários, por serem calos friáveis, aquosos e desuniformes (Figura 6). O cultivo destes calos primários teve continuidade até o aparecimento dos calos embriogênicos, aproximadamente após 30 dias (Figura 3), que foram selecionados e subcultivados separadamente (Figura 4). Quando estes calos primários foram transferidos ao meio de cultura sem auxina houve formação de raízes (Figura 5).

Os calos embriogênicos Tipo I, mostrados na Figura 11 em cultivo e na Figura 8 em corte anatômico, formaram-se em regiões dos calos primários (Figura 10) em alguns explantes, os quais foram isolados e cultivados em meio contendo ou não 2,4-D. Observou-se que em meio sem 2,4-D estes calos germinaram e formaram plantas agregadas (Figuras 12 e 13). Os calos embriogênicos Tipo I que foram subcultivados em meio contendo 2,4-D, aproximadamente após 20 dias formaram calos embriogênicos do Tipo II

(Figura 7). Os calos embriogênicos Tipo II também surgiram em regiões isoladas dos calos primários, aproximadamente após 90 dias de cultivo.

Os calos embriogênicos Tipo II foram mantidos em meio de multiplicação contendo 2,4-D e foram subcultivados a cada 30 dias (Figura 14).

2.3.3.2- Fase de diferenciação dos calos embriogênicos

Na diferenciação dos calos embriogênicos em embriões somáticos, inicialmente testaram-se níveis de citocininas (BAP, KIN, 2iP e ZEA) em meio de cultivo MS na ausência de auxina. Entretanto, nenhum resultado satisfatório foi obtido, havendo apenas a formação de calos compactos, em alguns meios. Resultados positivos com a presença de citocinina no meio de cultura foram obtidos por KACKAR et al. (1993) que diferenciaram calos embriogênicos de gengibre em meio de cultura contendo 8,9 μ M de Benziladenina. Da mesma forma, BABU et al. (1996) diferenciaram calos embriogênicos obtidos de ovários de gengibre em embriões globular em meio contendo 10 mg/L de Benziladenina e 0,2 mg/L de 2,4-D.

A diferenciação dos calos embriogênicos em embriões somáticos iniciou-se aproximadamente após 15 dias de cultivo (Figura 15). Com a presença de sacarose no meio de cultura, a diferenciação dos calos embriogênicos em embriões somáticos foi menor estando a maior parte dos embriões na fase globular ou Fase I. Somente no meio de cultura contendo 6% de sacarose na ausência de luz, houve maior crescimento dos embriões somáticos e 71,4% deles estavam no estágio de torpedo ou Fase II. Houve a formação de calos Tipo I nos tratamentos 4,5 e 6,0% de sacarose na ausência de luz (Tabela 2).

Tabela 2- Frequência de diferenciação de calos embriogênicos de gengibre em embriões somáticos nas fases e formação de calos compacto, na presença de níveis de sacarose em condições de luz e escuro.

		% Embriões	%	%	%
Sacarose	Condição	somáticos	Embriões	Embriões	Calos
(%)			Fase I	Fase II	Tipo I
3	Luz	25	100	-	-
	Escuro	50	100	-	-
4,5	Luz	25	100	-	-
	Escuro	50	100	-	25
6,0	Luz	37,5	100	-	-
	Escuro	87,5	28,6	71,4	25

REIDIBOYM-TALLEUX et al. (1999) obtiveram melhores resultados na diferenciação de embriões somáticos, quando utilizaram maltose no meio de cultura em *Prunus avium*. Semelhantemente, HIGUCHI e MAEDA (1991), adicionando sacarose ou manitol ao meio de cultura, estimularam a regeneração de embriões somáticos em calos de arroz.

O estímulo de diferenciação dos embriões somáticos ocorreu devido ao aumento da osmolaridade do meio de cultura ocasionada pela adição destes carboidratos. O mecanismo deste aumento na regeneração não é bem claro, mas pode ser mediado pelo aumento no nível endógeno de ácido abscísico (HIGUCHI e MAEDA, 1990). BRISIBE et al. (1994) adicionaram sorbitol ou ácido abscísico ao meio de cultura e ambos otimizaram a formação de calos embriogênicos e embriões somáticos em relação ao controle em cana-de-açúcar.

Nos tratamentos com maltose, na ausência de luz, 100% dos calos embriogênicos diferenciaram-se em embriões somáticos e aproximadamente 80% dos explantes regeneraram embriões somáticos na presença de luz (Tabela 3). Além disso, os embriões somáticos formados durante o período de cultivo em alguns meios com maltose já estavam mais desenvolvidos em relação aos meios com sacarose. A Figura 16 mostra os embriões somáticos na Fase II ou estágio torpedo e a Figura 9 o corte anatômico do embrião somático na Fase III, ou seja, de torpedo mais desenvolvido.

Tabela 3- Frequência de diferenciação de calos embriogênicos de gengibre em embriões somático nas fases, na presença de concentrações de maltose em condições de luz e escuro.

Maltose (%)	Condição	%Embriões somáticos	% Embriões		
			Fase I	Fase II	Fase III
3	Luz	75	33,3	-	66,7
	Escuro	100	-	100	-
4,5	Luz	75	33,3	66,7	-
	Escuro	100	-	50	50
6,0	Luz	87,5	100	-	-
	Escuro	100	100	-	-

CASTILLO et al. (1998) utilizaram a condição de escuro na indução e crescimento dos calos embriogênicos e fotoperíodo de 16 horas na regeneração dos embriões somáticos. Neste experimento a condição de escuro foi melhor tanto na fase de indução de calos como na diferenciação dos embriões somáticos.

2.3.3.3- Fase de germinação dos embriões somáticos e desenvolvimento das plântulas

A germinação dos embriões somáticos foi iniciada poucos dias após a transferência ao meio de germinação. Pelo teste de Tukey verificou-se que o número médio de embriões germinados diferiu estatisticamente, a 5% de probabilidade, sendo nos tratamentos com o meio MS com 50% da concentração dos sais maiores, em relação ao meio MS básico (Tabela 4).

Tabela 4- Número médio de embriões somáticos de gengibre germinados em meios de cultura, aos 30 dias de cultivo.

Tratamento	Embriões germinados	
• MS com 50% da concentração dos sais mais 0,2% de carvão ativado	31	a
• MS com 50% da concentração dos sais	28	a
• MS básico	19	b
• MS básico com 0,2% de carvão ativado	12	c

As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Observou-se que o desenvolvimento dos embriões era desuniforme e na mesma placa de Petri os embriões estavam em fases distintas (Figura 18).

Após 30 dias de cultivo dos embriões no meio de germinação, nas plantas formadas havia bom desenvolvimento do sistema radicular assim como da parte aérea e estas plantas foram então transferidas ao tubo de ensaio

contendo meio MS básico visando crescimento, onde permaneceram sendo posteriormente aclimatadas (Figura 17).

2.3.4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIMURA, C.T., FINGER, F.L., CASALI, V.W.D. A fast method for in vitro propagation of ginger. **Tropical Science**, v.40, p.86-91, 2000.

BABU, K.N., SAMSUDEEN, K., RATNAMBAL, M.J. *In vitro* plant regeneration from leaf-derived callus in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.29, p.71-74, 1992.

BABU, K.N., SAMSUDEEN, K., RATNAMBAL, M.J., RATNAMBAL, P.N., Embryogenesis and plant regeneration from ovary derived callus cultures of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) **Journal of Spices and Aromatic Crops**, v.5, n.2, p.134-138, 1996.

BHASKARAN, S., SMITH, R.H. Regeneration in cereal tissue culture: A review. **Crop Science**, v.30, p.1328-1336, 1990.

BRISIBE, E.A., MIYAKE, H., TANIGUCHI, T., MAEDA, E. Regulation of somatic embryogenesis in long-term callus cultures of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **New Phytologist**, v.126, p.301-307, 1994.

CARVALHO, C.H.S., BOHOROVA, N., BORDALLO, P.N. T., ABREU, L.L., VALICENTE, F.H., BRESSAN, W., PAIVA, E. Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes. **Plant Cell Reports**, v.17, p.73-76, 1997.

CASTILLO, A.M., EGAÑA, B., SANZ, J.M., CISTUÉ, L. Somatic embryogenesis and plant regeneration from barley cultivars grown in Spain. **Plant Cell Reports**, v.17, p.902-906, 1998.

DE LANGE, J.H., WILLER, P., NEL, M. Elimination of nematodes from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) by tissue culture. **Journal Horticultural Science**, v.62, p.249-252, 1987.

GEORGE, E. **Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1. The technology**. 2nd. Edition, London: Exegetics, 1993. 574p.

HIGUCHI, N., MAEDA, E. Enhanced plant regeneration in rice callus following abscisic acid treatment. **Jpn J. Crop Sci.** v.59, p.359-368, 1990.

HIGUCHI, N., MAEDA, E. Effect of pre-treatment with excess sucrose or mannitol on plant regeneration from rice callus cultures. **Jpn J. Crop Sci.** v.60, p.122-129, 1991.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: www.sidra.ibge.gov.br. Acesso em: julho de 2001.

INOUE, M., MAEDA, E., YOSHIDA, R., ORITANI, T. On the occurrence of a high content of cytokinins in rice callus tissues. **Plant Cell Physiology**, v.20, p.917-924, 1979.

KACKAR, A., BHAT, S.R., CHANDEL, K.P.S., MALIK, S.K. Plant regeneration via somatic embryogenesis in ginger. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.32, p.289-292, 1993.

MALAMUG, J.J.F., INDEN, H., ASAHIRA, T. Plantlet regeneration and propagation from ginger callus. **Scientia Horticulturae**, v.48, p.89-97, 1997.

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

PALAI, S.K., ROUT, G.R., DAS, P. Micropropagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) interaction of growth regulators and culture conditions. **Biotechnology of Spices, Medicinal & Aromatic Plants**, pp. 20-24, 1997.

REIDIBOYM-TALLEUX, L., DIEMER, F., SOURDIOUX, M., CHAPELAIN, K., MARCH, G.G. Improvement of somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*). Effect of maltose and ABA supplements. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.55, p.199-209, 1999.

ROUT, G.R., DAS, P. In vitro organogenesis in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**, v.4, n.4, p.41-51, 1997.

SAKAMURA, F., OGIHARA, K., SUGA, T., TANIGUCHI, K., TANAKA, R. Volatile constituents of *Zingiber officinale* rhizome produced by *in vitro* shoot tip culture. **Phytochemistry**, v.25, p.1333-1335, 1986.

SHARMA, T.R., SINGH, B.M., CHAUHAN, R.S. Production of disease free encapsulated buds of *Zingiber officinale* Rosc. **Plant Cell Reports**, v.13, n.5, p.300-302, 1994.

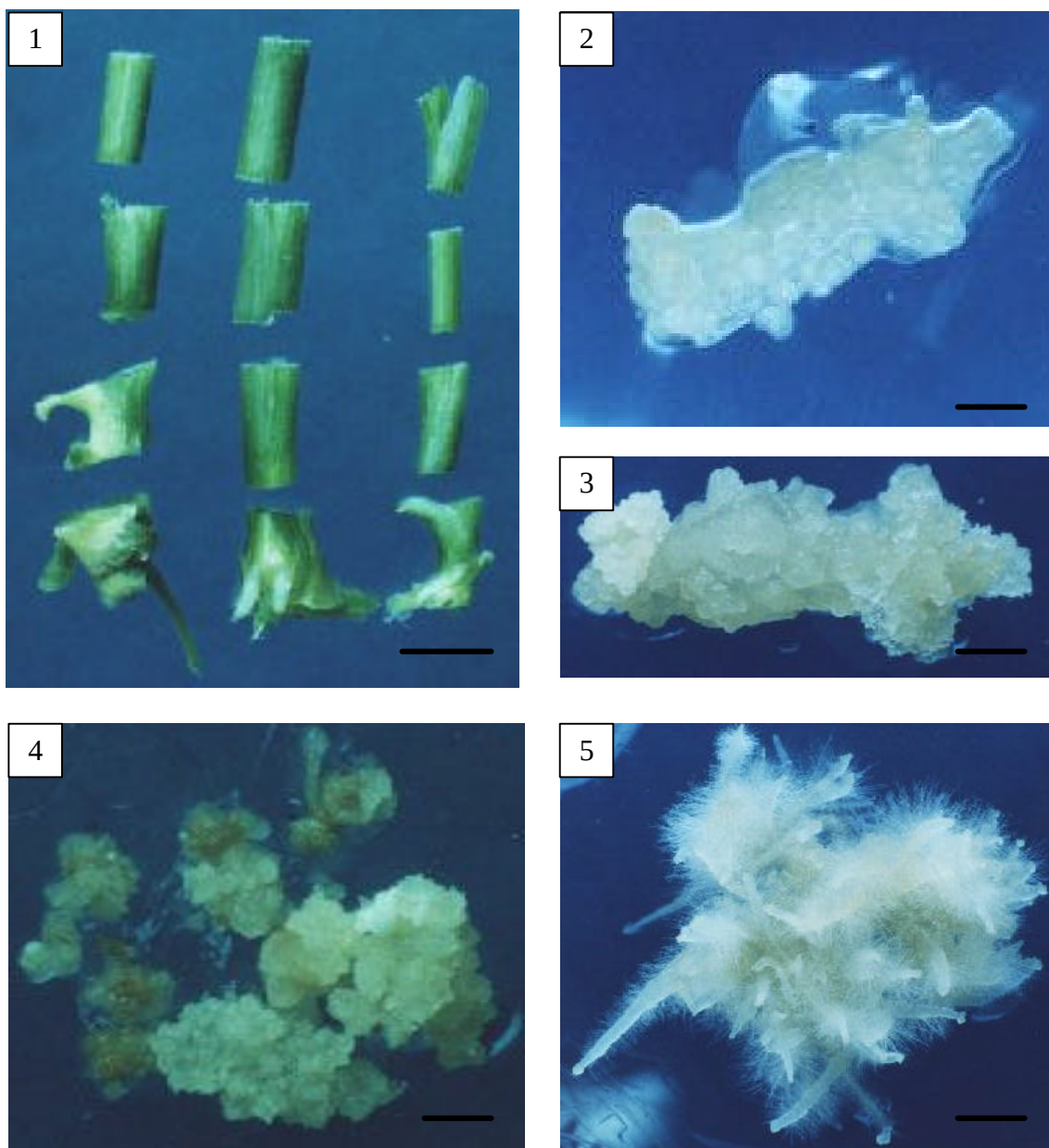
SHARMA, T.R., SINGH, B.M. Simple and cost-effective medium for propagation of ginger (*Zingiber officinale*). **Indian Journal of Agricultural Science**, v.65, n.7, p.506-8, 1995.

TEIXEIRA, J.B., SÖNDAHL, M.R., KIRBY, E.G. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.34, p.227-233, 1993.

VASIL, I.K. Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. **Biotechnology**, v.6, p.397-402, 1988.

VASIL, V., VASIL, I.K., LU, C. Somatic embryogenesis in long term callus cultures of *Zea mays* L. (Gramineae). **American Journal of Botany**, v.71, p.158-161, 1984.

ZARATE, R., YEOMAN, M.M. Changes in the amounts of (6) gingerol and derivatives during a culture cycle of ginger, *Zingiber officinale*. **Plant Science**, v.121, p.115-122, 1996.



Figuras 1- Limbo foliar de gengibre para indução de calos (escala 5 mm); 2- Início da formação de calos primários após 15 dias de cultivo (escala 1 mm); 3- Cultivo de calos primários após 30 dias e o aparecimento de uma sessão embriogênica (escala 1 mm); 4- Cultivo de calos primários aos 90 dias e o aparecimento de uma sessão embriogênica (escala 1 mm); 5- Formação de raízes em calos primários após 30 dias de cultivo (escala 1 mm).

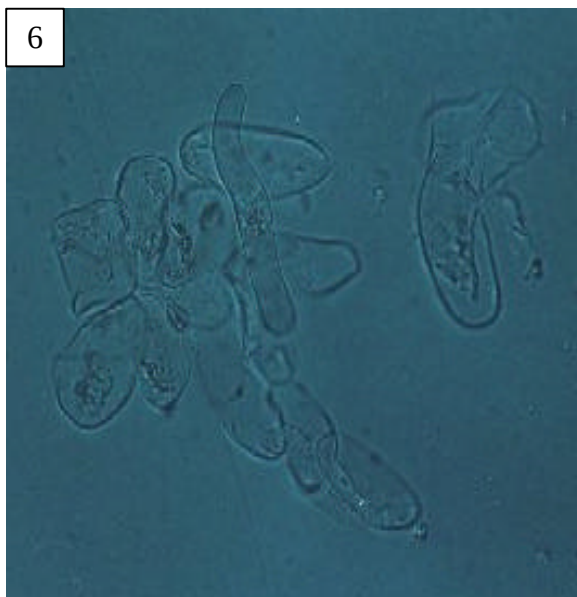


Figura 6- Calos primários de gengibre, após 30 dias de cultivo em meio de cultura para indução de calos.



Figura 7- Calos embriogênicos de gengibre, após 90 dias de cultivo em meio de cultura para indução de calos.

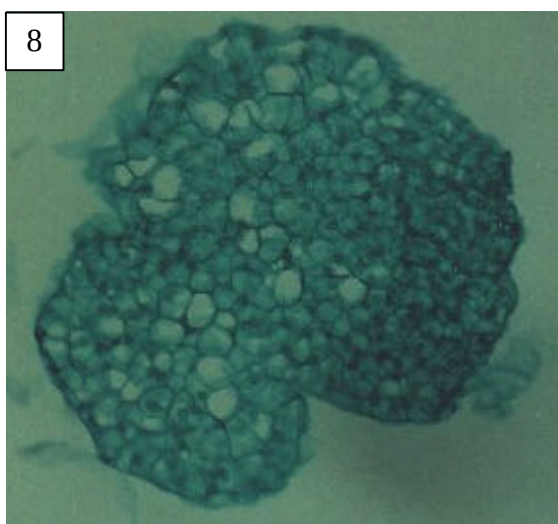


Figura 8- Corte anatômico de calos compactos de gengibre .



Figura 9- Corte anatômico de embrião somático de gengibre, obtido após 30 dias de cultivo em meio de diferenciação de embriões somáticos.

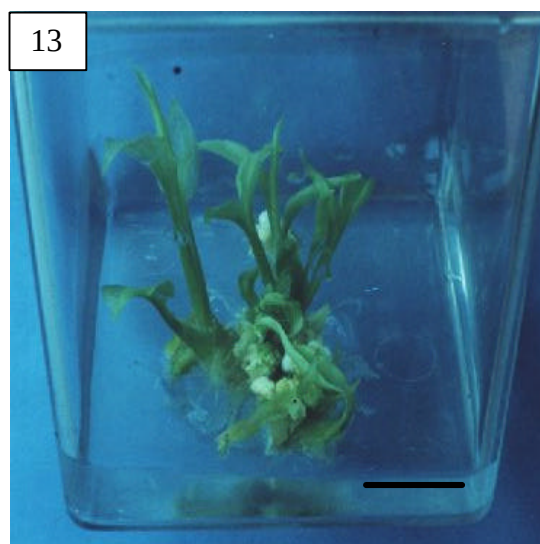
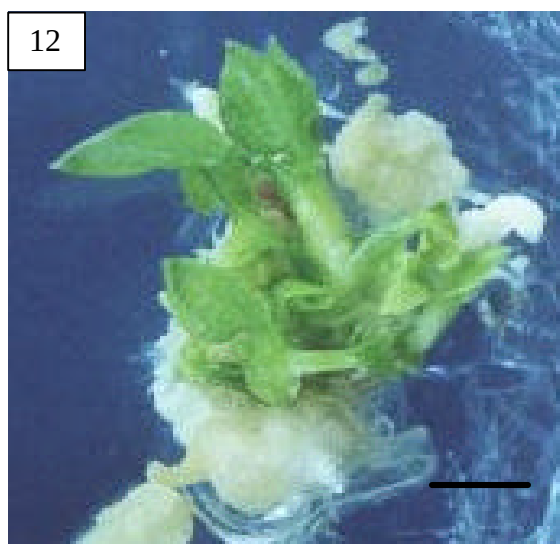
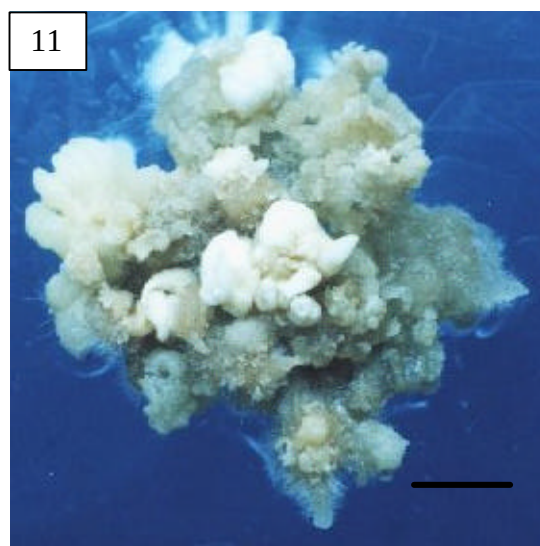
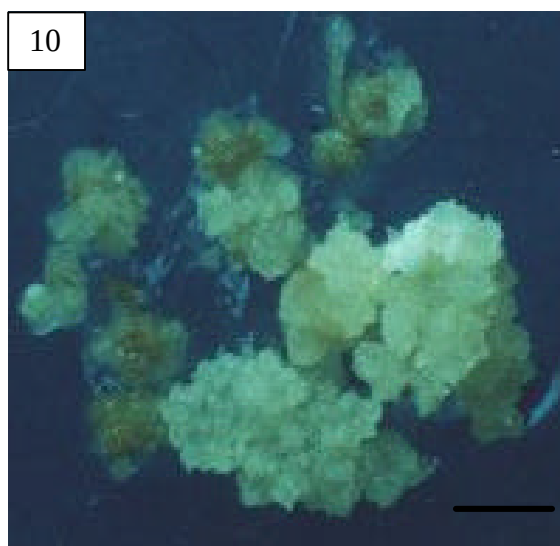


Figura 10- Cultivo de calos primários de gengibre após 90 dias em meio para indução de calos e o aparecimento de sessão embriogênica (Escala 5 mm); 11- Formação de calos compactos a partir de calos primários, após 30 dias de cultivo em meio para indução de calos (Escala 5 mm); 12- Regeneração de plantas de gengibre a partir de calos compactos após 30 dias de cultivo em meio de cultura sem auxina (Escala 5 mm); 13- Desenvolvimento de plantas de gengibre obtido de calos compactos após 15 dias de cultivo em meio de cultura sem auxina (Escala 10 mm).

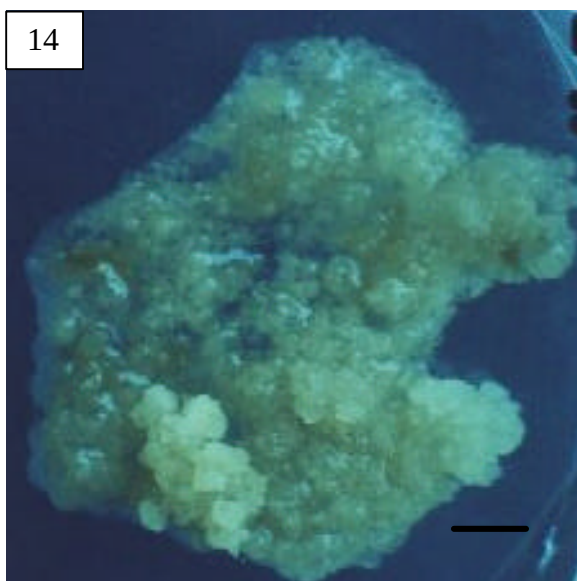


Figura 14- Cultivo de calos embriogênicos de gengibre para multiplicação em meio de cultura contendo auxina após 30 dias de cultivo (Escala 5 mm).

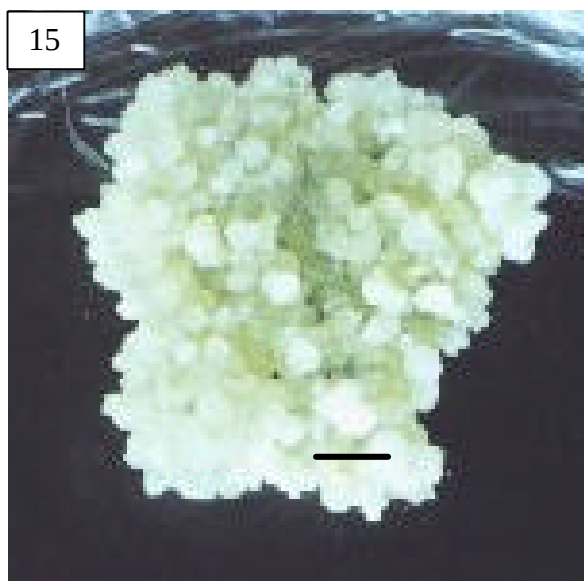


Figura 15- Diferenciação de calos embriogênicos de gengibre (Fase globular) após 15 dias em meio de cultura contendo maltose (Escala 5 mm).

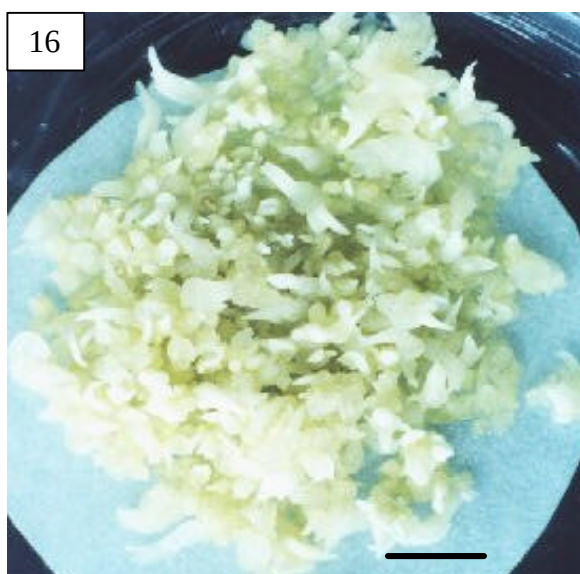


Figura 16- Diferenciação de calos embriogênicos de gengibre após 30 dias de cultivo em meio de cultura contendo maltose (Escala 10 mm).

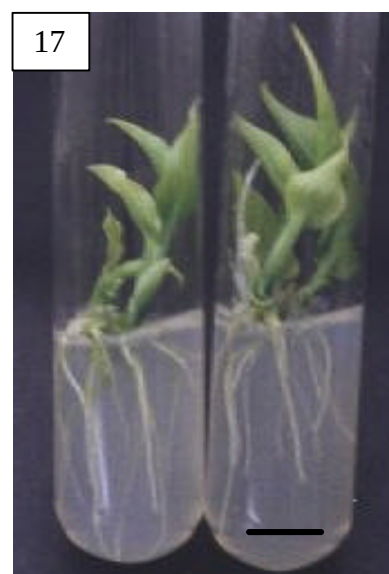


Figura 17- Plântulas de gengibre obtidas pela embriogênese somática após 30 dias de cultivo em meio MS básico (Escala 10 mm).

18

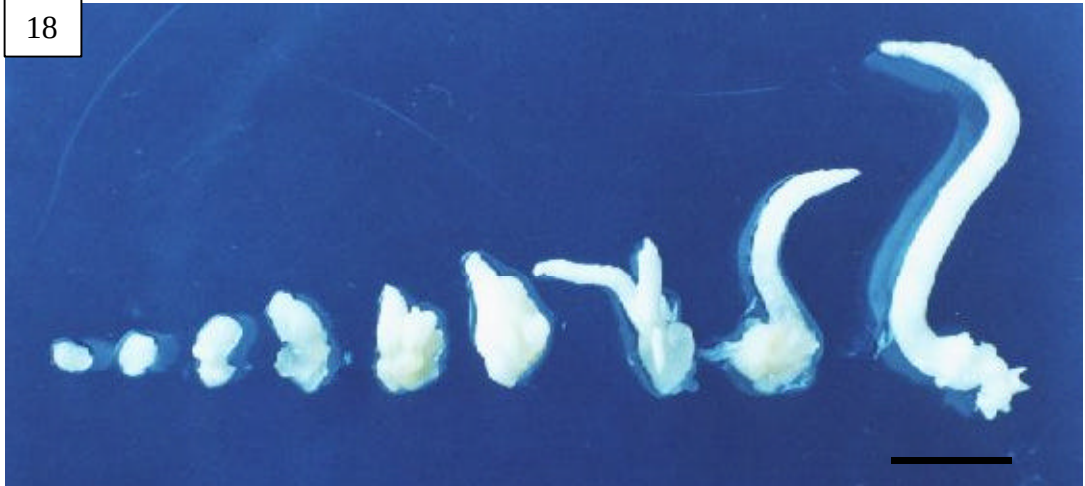


Figura 18- Fases de desenvolvimento de embriões somáticos de gengibre, cultivados em meio MS contendo maltose, após 30 dias de cultivo (Escala 5 mm).

2.4- COMPARAÇÃO DE RIZOMAS DE GENGIBRE ORIGINADOS DA PROPAGAÇÃO CONVENCIONAL E DE MUDAS MICROPROPAGADAS

2.4.1- INTRODUÇÃO

O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) monocotiledônea herbácea, perene, pertencente à família Zingiberaceae, compreende 47 gêneros e 1400 espécies. É muito apreciado e consumido em diversos países, devido às características medicinais, condimentares e aromáticas dos rizomas.

A propagação é realizada vegetativamente, por fragmentos de rizomas, normalmente obtidos da colheita anterior. Essa forma de propagação acarreta redução do volume comercial, uma vez que parte dos rizomas colhida permanece na propriedade destinados ao plantio seguinte (SHARMA e SINGH, 1995). Além disso, o cultivo repetido desses rizomas no mesmo solo, pode causar a redução da produção face ao empobrecimento do solo e ao ataque de pragas e doenças, que são passadas pelo solo ou pelos rizomas de propagação contaminados pelos fungos: *Fusarium oxysporum* Sch. f. sp. *zingiberi* (HOSOKI e SAGAWA, 1977), *Pythium* (BHAGYALAKSHMI e SINGH, 1988), *Armillariella mellea* e *Sclerotium rolfsii* (PEGG et al., 1974); pela bactéria *Ralstonia solanacearum* (HOSOKI e SAGAWA, 1977), por nematóides: *Meloidogyne incognita* e *M. javanica* (LANGE et al., 1987) e por vírus CMV - *Cucumber mosaic virus* (SAKAMURA e SUGA, 1989).

A micropropagação desta cultura tem o propósito de superar os problemas ocasionados pela propagação via rizomas, propiciando a limpeza clonal, além da obtenção de grande número de plantas. Dentre as formas de

obtenção de plantas pela cultura de tecidos em gengibre descritas por diversos autores, destacam-se: desenvolvimento de plantas por meio de gemas axilares ou ápices caulinares (PILLAI e KUMAR, 1982; IKEDA e TANABE, 1989; BHAGYALAKSHMI e SINGH, 1988), indução de brotações adventícias diretamente de explantes (LANGE et al., 1987; BALACHANDRAN et al., 1990; PALAI et al., 1997), indução de brotos por meio de segmentos nodais estiolados (ARIMURA et al., 2000) e a indução de calos de explantes e regeneração de brotos adventícios dos calos (MALAMUG et al., 1991; BABU et al., 1992; KACKAR et al., 1993; BABU et al., 1996; ROUT e DAS, 1997, FREITEZ e CÁSARES, 1997). Entretanto, pouco se sabe sobre o desenvolvimento no campo das plantas micropropagadas e dos respectivos rizomas obtidos nas gerações subseqüentes, em relação aos rizomas do método convencional de propagação.

BHAGYALAKSHMI et al. (1994) compararam rizomas de gengibre propagados convencionalmente e por mudas micropropagadas; nas plantas micropropagadas a produção foi menor com 8 meses de ciclo, entretanto com 10 meses não houve diferença significativa em relação ao método convencional. SMITH e HAMILL (1996) também avaliaram os rizomas de gengibre obtidos pelos dois métodos de propagação durante duas gerações, observando que na primeira geração a produção de rizomas foi menor nas plantas micropropagadas em relação à propagação pelos rizomas e na segunda geração não houve diferença na produção. PANDEY et al. (1997) avaliaram o efeito do fotoperíodo na dormência e formação de rizomas de gengibre em rizomas comerciais, plantas micropropagadas e rizomas de plantas micropropagadas em diferentes condições fotoperiódicas; a maior produção de rizomas frescos, foi obtida no

fotoperíodo de 12 horas e a produção de rizomas para fins propagativos foi melhor no fotoperíodo de 10 horas, assim como em condições naturais.

O objetivo do presente trabalho foi comparar morfológicamente rizomas do método de propagação convencional (rizomas-semente) com aqueles de mudas provenientes da cultura de tecidos.

2.4.2- MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos na Horta Nova do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa nos anos de 1997, 1998, 1999 e 2000. Foi avaliadas a produção e qualidade dos rizomas produzidos por mudas micropropagadas e pela propagação convencional e nos cultivos subsequentes utilizando-se na propagação os rizomas originados de mudas micropropagadas e pelo método convencional, durante quatro ciclos. As mudas de gengibre foram produzidas via cultura de tecidos, por meio de segmentos nodais estiolados (ARIMURA *et al.*, 2000) e aclimatadas em casa de vegetação por 30 dias sob nebulização intermitente enquanto que os rizomas-sementes foram obtidos do Banco de Germoplasma de Hortaliças do Departamento de Fitotecnia. O plantio foi realizado em sulcos, em solo previamente preparado e adubado. Os sulcos com profundidade de 20 cm foram espaçados de 40 cm tendo 10 metros de comprimento, sendo quatro sulcos por método de propagação. As mudas micropropagadas, após o período de aclimação, foram plantadas nos sulcos espaçadas de 30 cm. Os “rizomas-sementes” foram plantados no mesmo espaçamento. Durante a permanência das plantas no campo quantificou-se visualmente, o pegamento, o

crescimento, o número e dimensão das folhas. A colheita nas plantas de propagação convencional (PC) e de micropropagação (PM) foi realizada quando a parte aérea das plantas estava parcialmente seca e com os talos se destacando facilmente. Os rizomas foram lavados em água corrente e após a secagem em local sombreado durante 7 dias, de cada método de propagação 20 rizomas foram pesados (matéria fresca) e suas gemas foram contadas. Nos rizomas levados à estufa, a 60°C por 3 dias, foi obtido o peso de matéria seca.

Os rizomas restantes foram armazenados em galpão sombreado, e utilizados no ano seguinte na propagação. Nos anos subsequentes foram realizados os mesmos procedimentos de plantio e avaliação.

Os experimentos foram arranjados em delineamento inteiramente casualizado, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias de peso de matéria fresca e seca e o número médio de gemas dos rizomas após cada colheita, foram comparadas pelo teste F, a 5% de probabilidade. A análise da composição mineral foi realizada no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas do Departamento de Fitotecnia, utilizando-se dois rizomas de cada método de propagação. Os rizomas foram secos, moídos e submetidos às análises dos seguintes nutrientes: N, P, Ca, K, Mg, S, Mn, B, Fe, Zn e Cu.

2.4.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

O pegamento das mudas micropropagadas no campo foi 100%. Desde o início, o desenvolvimento das plantas pelo método de propagação convencional “rizoma-semente” foi melhor. Nas mudas micropropagadas

havia maior número de folhas que eram mais curtas (Figura 1), ao contrário das plantas desenvolvidas por rizomas com folhas mais alongadas, porém, em menor número (Figura 2). O mesmo foi relatado por SMITH e HAMILL (1996), que analisaram o desenvolvimento no campo de plantas micropropagadas e plantas obtidas pelo método convencional de propagação, observando que foram maiores o comprimento das folhas (111,3 cm e 84,9 cm, respectivamente) e a área foliar (900,9 cm²/broto e 536,7 cm²/broto, respectivamente) nas plantas de propagação convencional.

Em trabalhos anteriores de aclimação de plantas de gengibre obtidas de cultura de tecidos, BABU et al. (1992) relataram que nas plântulas produzidas *in vitro* e transplantadas ao substrato (solo: areia) a sobrevivência, ou estabelecimento das plantas, foi maior que 80% nos tratamentos onde a alta umidade foi mantida nas primeiras duas semanas após a transferência ao substrato. BHAGYALAKSHMI e SINGH (1988) obtiveram 90% de sobrevivência de plantas oriundas da cultura de tecidos em condições de casa de vegetação, quando transplantadas a vasos contendo quantidades iguais da mistura solo, esterco vegetal e areia. Todavia, nos dois trabalhos acima os autores não avaliaram o desenvolvimento posterior das mudas no campo.

Neste trabalho, observou-se na primeira colheita que os rizomas gerados na micropropagação formaram muitas raízes grossas (Figura 3), o mesmo não foi observado nos rizomas originados da propagação convencional (Figura 4).

2.4.3.1- PESO DA MATÉRIA FRESCA E SECA

No primeiro ciclo de cultivo, a produção de rizomas foi maior no método de propagação convencional, com diferença significativa à 5% de probabilidade em relação à micropropagação (Tabela 1). Resultados semelhantes foram obtidos por BHAGYALAKSHMI et al. (1994), justificando que esta diferença na produção, deveu-se à maior reserva no rizoma convencional, pois nas mudas micropropagadas não havia reservas iniciais; deveu-se também ao choque das mudas na fase de aclimação, ficando desta forma desfavorecidas.

No segundo ciclo de cultivo, ou seja, no cultivo dos rizomas colhidos no primeiro ciclo, a produção dos rizomas não foi significativa; o mesmo foi detectado por SMITH e HAMILL (1996), que observaram diferença significativa na produção de rizomas somente no primeiro ciclo de cultivo. No entanto, visualmente os rizomas de mudas micropropagadas eram bem distintos, principalmente pelo grande número de gemas.

No terceiro e quarto ciclo de cultivo a produção foi maior nos rizomas originados da propagação convencional; entretanto a partir do terceiro cultivo os rizomas formados de propagação convencional foram morfológicamente idênticos aos rizomas das mudas micropropagadas. As Figuras 5 e 6 mostram os rizomas obtidos na quarta colheita de Micropropagação (PM) e Propagação Convencional (PC), respectivamente.

Tabela 1- Peso por planta de matéria fresca (gramas) de rizomas de gengibre obtidos de propagação convencional e de micropropagação durante 4 ciclos de cultivo

TIPO DE PROPAGAÇÃO	CICLOS DE CULTIVO			
	1997	1998	1999	2000
Prop. Convencional	756.5 a	419.34 a	374.87 a	849.83 a
Micropropagação	260.25 b	455.83 a	200.32 b	625.36 b

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Tabela 2- Peso por planta de matéria seca (gramas) de rizomas de gengibre obtidos de propagação convencional e de micropropagação durante quatro ciclos de cultivo

TIPO DE PROPAGAÇÃO	CICLOS DE CULTIVO			
	1997	1998	1999	2000
Prop. Convencional	139,9 a	146.29 a	281.36 a	163.23 a
Micropropagação	69,3 b	164.13 a	74.97 b	113.5 b

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

2.4.3.2- NÚMERO DE GEMAS

O número médio de gemas nos dois primeiros ciclos foi significativamente maior nos rizomas de mudas micropropagadas não havendo diferença nos demais ciclos (Tabela 3). Os rizomas da micropropagação formaram número excessivo de gemas nos dois primeiros anos (Figura 3), e esta alta relação gemas/grama de matéria, indica que os rizomas de PM seriam mais indicados ao plantio visando o consumo fresco, assim como na forma de picles à partir das brotações, por constituírem-se basicamente de tecidos muito tenros.

PANDEY et al. (1997) também observaram que a produção de rizomas e o conteúdo de fibras em plantas micropropagadas foram significativamente menores que nas plantas propagadas convencionalmente.

A relação peso de matéria fresca/número de gemas foi calculada nos rizomas de micropropagação e propagação convencional (1º ano) e em rizomas de gerações subsequentes de PM e PC (Tabela 4). Esta relação é mais importante que o peso de matéria fresca total dos “rizomas-sementes”, por indicar melhor o aproveitamento na propagação. Quanto menor a relação peso de matéria fresca/número de gemas, maior será a área plantada, considerando o mesmo peso de rizomas, reduzindo o custo do “rizoma-semente” e no transporte.

Tabela 3- Número de gemas em rizomas de gengibre/planta, obtidos de propagação convencional e de micropropagação, durante 4 ciclos de cultivo

TIPO DE PROPAGAÇÃO	CICLOS DE CULTIVO			
	1997	1998	1999	2000
Prop. convencional	45,3 a	34,8 a	39,8 a	60,55 a
Micropropagação	72,9 b	55,15 b	31,1 a	64,95 a

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste F a 5% de probabilidade.

Tabela 4- Relação peso de matéria fresca/número de gemas de rizomas de gengibre obtidos de propagação convencional e de micropropagação, durante quatro ciclos de cultivo.

TIPO DE PROPAGAÇÃO	CICLOS DE CULTIVO			
	1997	1998	1999	2000
Prop. convencional	16,7	12,0	9,4	14,0
Micropropagação	3,6	8,2	6,4	9,6

2.4.3.3- COMPOSIÇÃO MINERAL

Pelos resultados (Tabela 5), observou-se que houve grande variação somente na quantidade dos micronutrientes entre os métodos de propagação. No primeiro ciclo houve grande diferença nos níveis dos elementos Fe e B, sendo praticamente 10 e 5 vezes maior nos rizomas de PM,

respectivamente, e nos demais elementos havia pequenas variações. No terceiro ciclo de cultivo nos níveis dos micronutrientes Mn, B e Fe os valores estavam bem acima que os rizomas obtidos via PM e no quarto cultivo somente o micronutriente B era seis vezes maior na PC em relação aos rizomas da PM. RESENDE et al. (1999) avaliaram o acúmulo de matéria seca e a absorção de nutrientes por plantas de alho provenientes de cultura de tecidos, e observaram que nos macronutrientes Ca, K e S e os micronutrientes Fe e Mn ocorreram as maiores diferenças de extração entre plantas provenientes de cultura de tecidos e propagação convencional.

Tabela 5- Composição mineral dos rizomas de gengibre obtidos na propagação convencional (PC) e na micropropagação (PM)

Mineral	1997		1998		1999		2000	
	(PC)	(PM)	(PC)	(PM)	(PC)	(PM)	(PC)	(PM)
NH ₄ (%)	0,93	1,06	1,02	1,04	0,95	1,16	0,51	0,71
NO ₃ (%)	0,02	0,01	0,04	0,003	0,03	0,01	0,03	0,02
P (%)	0,23	0,25	0,15	0,29	0,31	0,39	0,15	0,13
K (%)	3,69	3,69	3,55	3,14	5,83	4,62	3,93	3,83
S (%)	0,10	0,12	0,09	0,09	0,11	0,13	0,06	0,07
Mg (%)	0,23	0,26	0,26	0,27	0,23	0,29	0,20	0,27
Ca (%)	0,19	0,18	0,21	0,19	0,25	0,27	0,18	0,18
Mn (ppm)	7,89	11,10	4,94	7,21	5,57	25,68	9,23	8,15
B (ppm)	0,21	1,16	0,49	0,58	0,14	0,56	0,34	0,06
Fe (ppm)	5,47	57,71	66,01	91,61	19,59	72,72	19,64	25,30
Cu (ppm)	0,86	0,99	0,89	1,15	0,86	1,18	0,63	0,52
Zn (ppm)	1,49	2,15	1,75	3,32	1,73	3,30	0,73	0,67

Os resultados revelaram que mudas de gengibre produzidas pela micropropagação podem ser utilizadas na propagação, desde que sejam plantadas por três gerações de multiplicação em condições de rigoroso controle de pragas e doenças.

2.4.4- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAMINE, E. K. Storage of fresh ginger rhizomes. **Bull. Hawai Agric. Exp. Sta.** v.130, p.5-23, 1962.

BABU, K.N., SAMSUDEEN, K., RATNAMBAL, M.J. In vitro plant regeneration from leaf derived callus in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** v.29, p. 71-74, 1992.

BALACHANDRAN, S.M., BRAT, S.R., CHANDEL, K.P.S. In vitro clonal multiplication of turmeric (*Curcuma* spp) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). **Plant Cell Reports**, v.8, p.521-524, 1990.

BHAGYALAKSHMI, SHANTHI, N., SINGH, N.S. The yield and quality of ginger produced by micropropagated plants as compared with conventionally propagated plants. **Journal of Horticultural Science**, v.69, n.4, p.645-651, 1994.

BHAGYALAKSHMI, SINGH, N.S. Meristem culture and micropropagation of a variety of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) with a high yield of oleoresin. **Journal of Horticultural Science**, v.63, n.2, p.321-327, 1988.

CASTRO, J.V., TANIWAKI, M.H., AGUIRRE, J.M. et al. Aspectos tecnológicos da conservação de gengibre. **Horticultura Brasileira**, v.6, n.1, p.50, 1988.

COLBRAN, R.C. Nematode control lifts ginger yields. **Queensland Agricultural Journal**, v.94, p.603-605, 1968.

DEKKERS, A.J., RAO, A.N., GOH, C.J. In vitro storage of multiple shoot cultures of ginger at ambient temperature of 24-29 degrees-C. **Scientia Horticulturae**, v.47, p.157-167, 1991.

DOHROO, N.P. Seed transmission of pre-emergence rot and yellows in ginger. **Plant Disease Research**, v.4, p.73-74, 1989.

GOTTLIEB, O.R., SALATINO, A. Função e evolução de óleos essenciais e de suas estruturas secretoras. **Ciência e Cultura**, v, 39, p.708-716, 1987.

HOSOKI, T., SAGAWA, Y. Clonal propagation of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) through tissue culture. **HortScience**, v.12, n.5, p.451-452, 1977.

IKEDA, L.R., TANABE, M.J. In vitro subculture applications for ginger. **HortScience**, v.24, p.142-143, 1989.

KACKAR, A., BHAT, S.R., CHANDEL, K.P.S., et al. Plant regeneration via somatic embryogenesis in ginger. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v.32, p.289-292, 1993.

LANA, M.M., CASALI, V.W.D., FINGER, F.L. et al. Avaliação da conservação pós-colheita de rizomas de gengibre. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.11, p.139-141, 1993.

LANGE, J.H., WILLERS, P., NEL, M. Elimination of nematodes from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) by tissue culture. **Journal of Horticultural Science**, v.62, n.2, p.249-252, 1987.

LAVABRE, M. **Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais**. Rio de Janeiro: Record, 1990. 172 p.

MALAMUG, J.J.F., INDEN, H., ASAHIRA, T. Plantlet regeneration and propagation from ginger callus. **Scientia Horticulturae**, v.48, p.89-97, 1991.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1994. 220 p.

PANDEY, Y.R., SAGWANSUPYAKORN, C., SAHAVACHARIN, O., THAVEECHAI, N. Effect of planting material on growth and seed rhizome

yield of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**. v.31, p.445-454, 1997.

PAULL, R.E., CHEN, N.J., GOO, T.T.C. Composition changes in ginger rhizomes during storage. **Journal American Society Horticultural Science**, v.113, n.4, p.584-588, 1988.

PEGG, K.G., MOFFETT, M.L., COLBRAN, R.C. Diseases of ginger in Queensland. **Queensland Agricultural Journal**, v.100, p.611-618, 1974.

PILLAI, S.K., KUMAR, K.B. Note on the clonal multiplication of ginger in vitro. **Indian Journal Agriculture Science**, v.52, n.6, p.397-399, 1982.

RESENDE, F.V., FAQUIN, V., SOUZA, R.J., SILVA, V.S. Acúmulo de matéria seca e exigências nutricionais de plantas de alho provenientes de cultura de tecidos e de propagação convencional. **Horticultura Brasileira**, v.17, n.3, p.220-226, 1999.

SAKAMURA, F. Changes in volatile constituents of *Zingiber officinale* rhizomes during storage and cultivation. **Phytochemistry**. v.26, p.2207-2212, 1987.

SAKAMURA, F., OGIHARA, K., SUGA, T. et al. Volatile constituents of *Zingiber officinale* rhizome produced by *in vitro* shoot tip culture. **Phytochemistry**, v.25, p.1333-1335, 1986.

SAKAMURA, F., SUGA, T. Biotechnology in agriculture and forestry. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1989. v.7, p.524-538.

SHARMA, T.R., SINGH, B.M. Simple and cost-effective medium for propagation of ginger (*Zingiber officinale*). **Indian Journal Agricultural Sciences**, v.65, n.7, p.506-508, 1995.

SHARMA, T.R., SINGH, B.M., CHAUHAN, R.S. Production of disease free encapsulated bubs of *Zingiber officinale* Rosc. **Plant Cell Reports**, v.13, n.5, p.300-302, 1994.

SMITH, M.K., HAMILL, S.D. Field evaluation of micropropagated and conventionally propagated ginger in subtropical Queensland. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 36, n. 3, p. 347-54, 1996.

ZARATE, R., YEOMAN, M.M. Changes in the amounts of (6) gingerol and derivatives during a culture cycle of ginger, *Zingiber officinale*. **Plant Science**, v.121, p. 115-122, 1996.



Figura 1- Planta de gengibre obtida pela micropropagação após 50 dias de cultivo (Escala 5 cm).



Figura 2- Planta de gengibre obtida pela propagação convencional após 50 dias de cultivo (Escala 5 cm).



Figura 3- Rizoma de gengibre obtido no primeiro cultivo de muda micropropagada (Escala 25 mm).



Figura 4- Rizoma de gengibre obtido no primeiro cultivo pela propagação convencional (Escala 25 mm).



Figura 5- Rizoma obtido no quarto cultivo por muda micropropagada (Escala 25 mm).



Figura 6- Rizoma obtido no quarto cultivo pela propagação convencional (Escala 25 mm).