

# MICROPROPAGAÇÃO DE GENGIBRE (*Zingiber officinale*)

## MICROPROPAGATION OF GINGER (*Zingiber officinale*)

DEBIASI, Clayton<sup>1</sup>; FELTRIN, Fabiana<sup>2</sup>; MICHELUZZI, Fernanda de C.<sup>3</sup>

### RESUMO

O cultivo do gengibre (*Zingiber officinale*), executado principalmente nos estados do sul do Brasil, destaca-se por destinar grande parte de sua produção ao mercado exterior. Um grande problema da cultura está na produção de mudas, que convencionalmente acarreta problemas fitossanitários. Este trabalho objetivou o desenvolvimento inicial de um protocolo de micropropagação de gengibre. Gemas rizomatosas com aproximadamente 0,5cm<sup>3</sup> foram submersas em soluções assépticas de hipoclorito de sódio 3% (0, 5, 10 e 20 minutos) e de etanol 70%(0 e 2 minutos), inoculadas em meio de cultura MS e mantidas a 26±2°C, fotoperíodo de 16 horas a 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> por 20 dias. Depois de obtido e adotado o método asséptico, novas gemas rizomatosas foram estabelecidas em meio de cultura MS, suplementados com BAP (0 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>) e AIA (0 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>). A imersão das gemas por 10 ou 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio 3% associada a 2 minutos em solução de álcool 70% inibiu a contaminação por microorganismos. As médias do número de brotos emitidos aos 30 dias de cultivo indicaram o tratamento 3 (1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP) como destaque, com 4,10 novos brotos. Já em relação ao tamanho das brotações o destaque foi para o tratamento 1 (sem suplementação de fitorreguladores), com crescimento médio de 3,13 cm de altura.

Palavras-chave: Micropropagação, *Zingiber officinale*, produção de mudas, gemas rizomatosas.

### INTRODUÇÃO

A gama de espécies utilizadas para fins medicinais é significativamente grande e a tendência é que aumente ainda mais, já que as pesquisas e estudos relacionados a este assunto, crescem a cada dia nas instituições de ensino e pesquisa, além de haver uma mobilização mundial para que se adote cada vez mais os medicamentos fitoterápicos.

No presente trabalho deu-se importância ao estudo do gengibre (*Zingiber officinale* R.), uma planta originária da Ásia Tropical e do Arquipélago Malaio que vem sendo cultivada mundialmente como monocultura e no Brasil, principalmente no Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina, onde aproximadamente 70% da produção destina-se a exportação para os países como a Holanda, Canadá, Alemanha e Estados Unidos.

Um dos grandes problemas da cultura está relacionado à produção de mudas com qualidade genética e fitossanitária. Convencionalmente, os produtores propagam vegetativamente o gengibre, produzindo suas próprias mudas. Porém, esta prática acarreta vários problemas fitossanitários, dentre eles a disseminação de doenças a cada ciclo da cultura, o que pode levar a destruição total das plantações devido à disseminação

rápida, principalmente de fungos (*Fusarium oxysporium*, *Armillariella mellea* e *Sclerotium rolfsii*), nematóides (*Meloidogyne incognita* e *M. javanica*) e bactérias (*Ralstonia solanacearum*, *Erwinia carotovora*). Sendo assim, o presente trabalho objetivou iniciar o desenvolvimento de um protocolo de micropropagação, através do estabelecimento *in vitro* de gemas rizomatosas de *Z. officinale*, possibilitando a produção massal de mudas de qualidade fitossanitária e genética.

### MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Micropropagação Vegetal do Departamento de Ciências Naturais da FURB.

Para os testes de assepsia, gemas rizomatosas de gengibre foram coletadas, reduzidas ao um tamanho inicial aproximado de 0,5-1,0 cm<sup>3</sup> e imersas em água esterilizada. Em bancada de trabalho e repetindo em câmara de fluxo laminar, foram submetidas a diferentes combinações de tempos de imersão em soluções assépticas de hipoclorito de sódio 3% (0, 5, 10 e 20 minutos) e de etanol 70%(0 e 2 minutos), totalizando sete tratamentos. Após o processo de assepsia, as gemas foram inoculadas em meio de cultura MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado com sacarose (30 g L<sup>-1</sup>), ágar (7,0 g L<sup>-1</sup>), pH ajustado para 5,8 e as culturas mantidas em sala de crescimento a 27±2°C, 16 horas de fotoperíodo a 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de intensidade luminosa por 20 dias. Neste período foram avaliados o percentual de gemas não contaminadas e o percentual de contaminação individualizado conforme o tipo de agente contaminante.

Nos testes de suplementação do meio de cultura MS com reguladores de crescimento, gemas rizomatosas reduzidas ao tamanho da 1ª etapa. Em seguida os explantes foram reduzidos para 0,5 cm<sup>3</sup> e inoculadas em meios de cultura MS com pH 5,8, suplementados com sacarose (30), ágar (7,0 g L<sup>-1</sup>) e AIA (0 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>) ou BAP (0 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>), totalizando 3 tratamentos: T1= MS, T2=MS+1,0mg L<sup>-1</sup> de AIA+1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP) e T3 (MS+1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP).

As culturas foram mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente, permanecendo por 30 dias, sendo avaliados, aos 15 e 30 dias de cultivo, o número médio de brotações induzidas, altura média das brotações induzidas, o percentual total de contaminação, o percentual de contaminação individualizada conforme o tipo de agente contaminante e o fenótipo das plantas micropropagadas. As plantas micropropagadas foram ao final do período de cultivo *in vitro*, aclimatadas em potes plásticos contendo casca de

<sup>1</sup>Engº. Agrº. Doutorando em Agronomia (Horticultura) pela FCA/UNESP/Botucatu-SP. Laboratório de Biotecnologia Micropropagação Vegetal, DCN/T-104, FURB, Caixa Postal 1507, 89010-971, Blumenau-SC. Fone (047) 321-0436. debiasi@furb.br

<sup>2</sup>Bióloga. Laboratório de Biotecnologia Micropropagação Vegetal, DCN/T-104, FURB, Caixa Postal 1507, 89010-971, Blumenau-SC. variegata@hotmail.com

<sup>3</sup>Acadêmica de Biologia e bolsista de iniciação científica CNPq. Laboratório de Biotecnologia Micropropagação Vegetal, DCN/T-104, FURB, Caixa Postal 1507, 89010-971, Blumenau-SC. nandamich@oktober.com.br

(Recebido para Publicação em 05/05/2003, Aprovado em 05/02/2004)

arroz carbonizado e areia (1:1), permanecendo em casa de vegetação por um período de 60 dias com redução solar de 50% e recebendo irrigações diárias por nebulização.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação aos métodos diferenciais de assepsia empregados, foram observadas respostas diferenciais das gemas de gengibre estabelecidas *in vitro*, variando conforme o tempo de imersão nas soluções assépticas de etanol a 70% e hipoclorito de sódio a 3%.

Após 20 dias de cultivo *in vitro*, pode-se notar a superioridade da assepsia das gemas nos tratamentos 5 (10 minutos em hipoclorito de sódio 3% e 2 minutos em álcool 70%) e 7 (20 minutos em hipoclorito de sódio 3% e 2 minutos em álcool 70%) em relação aos demais. No que diz respeito aos percentuais de gemas não contaminadas, os tratamentos 5 e 7 apresentaram 100% de gemas não contaminadas, enquanto que o tratamento 1 (nenhuma imersão em soluções assépticas) ocorreu o inverso, isto é, 100% de gemas comprometidas pela presença de agentes contaminantes (Figura 1).

É constante a utilização do hipoclorito de sódio, nas mais variadas concentrações, como forma de assepsia. Em processos de biotecnologia vegetal, as soluções de hipoclorito de sódio são amplamente empregadas nos processos assépticos das fontes de explante para o estabelecimento inicial *in vitro* de uma série de espécies. SHARMA & SINGH (1997) trabalharam com multiplicação massal *in vitro* de gengibre, cultivar Himachal pradesh, visando a produção de mudas isentas de *Fusarium oxysporum* F., sp. zingiberi utilizaram gemas rizomatosas com 0.5-1.0 cm submetidas a assepsia em solução de HgCl<sub>2</sub> (0.1%) + 2 gotas de detergente Tween-20 por 10-12 minutos e 3 lavagens em água esterilizada, obtiveram 60% de sucesso na eliminação de agentes contaminantes no estabelecimento inicial. Atualmente estes agentes descontaminantes não estão mais sendo utilizados devido a contaminação provocada pelo mercúrio ao meio ambiente.

Muitos foram os agentes biológicos contaminantes observados nesta etapa do trabalho, e mesmo não sendo realizadas análises de identificação individuais, pode-se observar a ocorrência de vários tipos de fungos e bactérias associados às gemas de gengibre inoculadas *in vitro*.

Como agentes de contaminação, os fungos foram observados em maior quantidade quando comparados à ocorrência de bactérias (Figura 2). Os fungos observados foram principalmente dos tipos filamentosos (bolores), surgindo em grande quantidade de esporos e alta diversidade de espécies, provenientes tanto de contaminação endógena quanto exógena. Geralmente cultivo *in vitro* de órgãos subterrâneos, é comum a contaminação por fungos e bactérias de origem endógena. Estes resultados coincidem com os relatos por SHARMA & SINGH (1997) que, trabalhando com o estabelecimento *in vitro* de Gengibre, cultivar Himachal pradesh, relataram a ocorrência de agentes contaminantes dos tipos fungos e bactérias, com maior intensidade verificada para o primeiro e em grande variedade.

A suplementação do meio de cultura MS com reguladores de crescimento, mostrou respostas diferenciais das gemas de Gengibre estabelecidas *in vitro*, variando conforme o tipo, concentração, combinação ou mesmo na ausência destes (figura 3). No que diz respeito ao número médio de brotações emitidas aos 15 dias de cultivo, não foram observadas

diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos aplicados, porém o destaque ficou por conta do tratamento 1 (MS isento de suplementação com fitoreguladores), o qual induziu uma média de 3,02 novos brotos a cada gema inoculada.

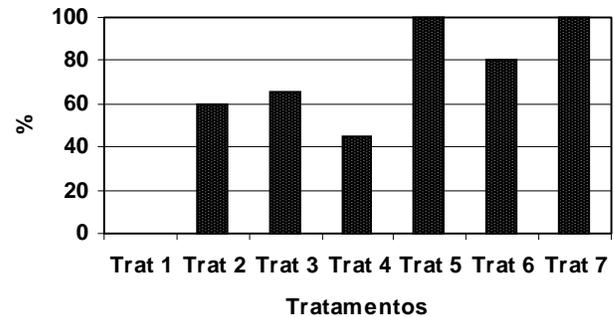


Figura 1 - Índices percentuais totais de gemas rizomatosas de Gengibre (*Zingiber officinale* R.), isentas de contaminação, cultivados em meio de cultura MS após 20 dias *in vitro*, submetidas a diferentes tratamentos assépticos: T1; T2 (5 minutos em hipoclorito de sódio 3%); T3(5 minutos em hipoclorito de sódio 3% + 2 minutos em etanol 70%); T4(10 minutos em hipoclorito de sódio 3%); T5(10 minutos em hipoclorito de sódio 3% + 2 minutos em etanol 70%); T6(20 minutos em hipoclorito de sódio 3%); T7(20 minutos em hipoclorito de sódio 3% + 2 minutos em etanol 70%). (N=10)

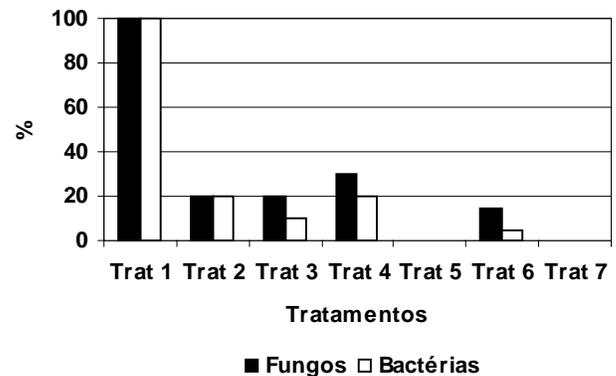


Figura 2 - Índices percentuais de contaminação, dos tipos fungos e bactérias, em gemas de Gengibre cultivadas em meio MS de cultura após 20 dias *in vitro*, submetidas a diferentes tratamentos assépticos: T1; T2 (5 minutos em hipoclorito de sódio 3%); T3(5 minutos em hipoclorito de sódio 3% + 2 minutos em etanol 70%); T4(10 minutos em hipoclorito de sódio 3%); T5(10 minutos em hipoclorito de sódio 3% + 2 minutos em etanol 70%); T6(20 minutos em hipoclorito de sódio 3%); T7(20 minutos em hipoclorito de sódio 3% + 2 minutos em etanol 70%). (N=10)

Referente ao tamanho médio das brotações, verificou-se igualmente a não existência de diferença estatística significativa entre os tratamentos aplicados e o destaque

novamente para o tratamento 1 (MS isento de suplementação fitorreguladores), com tamanho médio de brotos de 1,60 cm de altura. Aos 30 dias de cultivo os resultados referentes às médias do número de brotações mostram que os tratamentos não diferiram estatisticamente entre si, porém o tratamento 3 (MS+1.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP) se sobressaiu em relação aos demais, com indução média de 4,10 novos brotos. Já os tratamentos 1 (MS isento de suplementação com fitorreguladores) e 2 (MS+1.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP+1.0 mg L<sup>-1</sup> de AIA), apresentaram médias de 4,04 e 3,87 novos brotos emitidos por gema inoculada, respectivamente, após os 30 dias de cultivo *in vitro* (Figura 3).

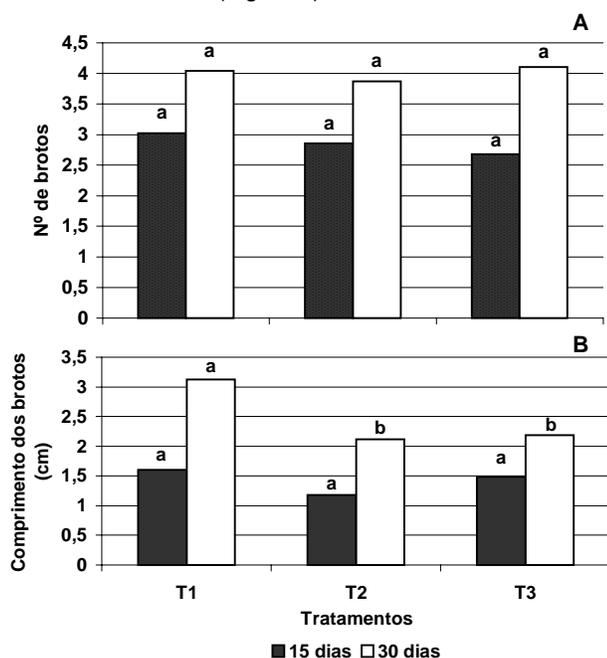


Figura 3 - Número médio (A) e comprimento médio (B) de brotos de Gengibre (*Zingiber officinale*) emitidos por explantes iniciais referentes aos 15 e 30 dias de cultivo *in vitro* nos diferentes tratamentos (T1=MS, T2=MS+1,0mg L<sup>-1</sup> de AIA+1,0mg L<sup>-1</sup> de BAP e T3=MS+1,0mg L<sup>-1</sup> de BAP). Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey 5%. (N=10)

Na Figura 4 podemos observar os efeitos dos tratamentos na padronização morfo genética da resposta *in vitro* das gemas rizomatosas de gengibre, onde podemos notar o efeito marcante do tratamento isento de reguladores de crescimento. ARIMURA et al. (2002) suplementaram o meio MS com 0,25 mg L<sup>-1</sup> de ANA+0,5 mg L<sup>-1</sup> de BAP e obtiveram média de 0,92 brotos como o melhor resultado no estabelecimento *in vitro* de gemas de Gengibre. SHARMA & SINGH (1997), cultivaram gemas de Gengibre, cultivar Himachal Pradesh, em meio de cultura MS suplementado com os fitorreguladores BAP ou KIN (Cinetina)+AIA, AIB (Ácido Indol-Butírico) ou ANA (Ácido Naftaleno-Acético) e os resultados mostraram que a suplementação isolada do meio de cultura MS com 8 mg/L de KIN induziu uma média de 4,3 novos brotos e a suplementação combinada com 2 mg L<sup>-1</sup> de KIN+2 mg L<sup>-1</sup> de AIB, induziu uma média de 7 brotos. Ainda HOSOKI & SAGAWA (1977) conseguiram através da micropropagação do

gengibre, uma média proliferativa de 6 novos brotos por explante inicial.

As taxas médias proliferativas obtidas neste trabalho estão muito próximas àquelas obtidas por BALACHANDRAN et al. (1990), os quais trabalhando com gemas *in vitro* de gengibre obtiveram média de 4 novos brotos por explante, após 4 semanas, utilizando o meio MS+ 3mg L<sup>-1</sup> de BAP.

A formação de gemas laterais é um processo de organogênese direta comandado pela dominância apical, na presença de um balanço AIA/Citocininas favorável as Citocininas (TAIZ & ZEIGER, 2004) e segundo DEBIASI (2000), aspectos relacionados ao controle do desenvolvimento destas gemas vem sendo amplamente estudados e relatados nos últimos anos, enfatizando o efeito dos reguladores de crescimento, da luz, da vascularização e dos nutrientes. A interação destes fatores pode ser um dos pontos para se explicar às diferenças na capacidade de multiplicação e desenvolvimento das gemas rizomatosas do gengibre neste trabalho.



Figura 4 - Efeitos dos tratamentos (T1=MS, T2=MS+1,0 mg L<sup>-1</sup> de AIA+1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e T3=MS+1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP) aplicados sobre o padrão comportamental morfo genético de gemas rizomatosas de *Zingiber officinale* R. após 30 dias de cultivo *in vitro*.

A altura média das brotações, aos 30 dias de cultivo *in vitro*, mostrou diferença estatística significativa entre os tratamentos aplicados, onde o destaque foi para o tratamento 1 (MS isento de suplementação com reguladores de crescimento), induzindo um crescimento médio das brotações de 3,13 cm de altura. DEBIASI (2000), depois de observações realizadas na micropropagação da bananeira, relata que a altura média das brotações micropropagadas é inversamente proporcional à taxa proliferativa, ou seja, quanto maior a altura média, menor será o número médio de brotos formados. Esta informação é confirmada neste trabalho, já que as maiores médias em altura dos novos brotos emitidos foram verificadas no meio de cultura MS isento da suplementação com os reguladores de crescimento, com menores taxas proliferativas. Já INDEN & ASAHIRA (1988), também trabalhando com o

gengibre, obtiveram maior tamanho de brotos (1,42 cm) em meio MS contendo combinações semelhantes de ANA e BAP.

Já o tratamento 3 (MS+1.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP) e o tratamento 2 (MS+1.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP+1.0 mg L<sup>-1</sup> de AIA), apresentaram alturas médias de 2,19 e 2,12 cm respectivamente para os novos brotos emitidos, sendo significativamente menores que os tamanhos notados no tratamento 1 (MS isento de regulador de crescimento). ARIMURA et al (2002) comprovou que a utilização combinada de 2,69 µM de ANA e 8,88 µM de BAP na suplementação do meio de cultura MS, induziu igualmente os menores comprimentos de brotações de gengibre após 60 dias de cultivo.

A diferença observada nas avaliações realizadas entre os intervalos de 15 e 30 dias de cultivo *in vitro*, demonstrou o aumento expressivo no alongamento das plantas, principalmente no tratamento 1 (MS isento de regulador de crescimento), ficando evidente que não existe, para esta espécie, nenhum fator de efeito direto do BAP e AIA, aplicado de forma exógena, em estimular o crescimento das brotações e sim na indução destas. Dessa forma, a adição de BAP (1,0 mg L<sup>-1</sup>) ao meio de cultura MS (tratamento 3), proporcionou aumento na taxa proliferativa, porém com altura reduzida. Estes resultados não são semelhantes para todas as espécies cultivadas *in vitro*, já que existem relatos contrariando este padrão. BIASE (1993) e PINTO et al. (1994) trabalharam com a multiplicação *in vitro* de abacateiro e de *Kielmeyera coriacea*, respectivamente, e encontraram brotos maiores em meios de cultura suplementados com reguladores de crescimento, do que em meios isentos destes reguladores.

As avaliações realizadas neste trabalho, referentes as possíveis alterações fenotípicas das plantas micropropagadas de gengibre, demonstram a não ocorrência de qualquer tipo de anormalidade mediante a aplicação da metodologia descrita. A utilização no presente trabalho de gemas rizomatosas como explante inicial, a suplementação do meio de cultura MS com apenas 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP e AIA, e a realização de apenas um subcultivo, talvez tenham sido os motivos que explicam a não ocorrência de variantes somaclonais, já que existem conceitos e referências que relatam estas possibilidades. Para SMITH (1988) e ZAFFARI et al. (1995), as alterações genéticas induzidas na micropropagação seriam influenciadas pelo tipo do explante, pela composição do meio de cultura, pelo número de subcultivos e pelo nível organizacional do tecido.

D'AMATO (1978) levanta a hipótese de que as células meristemáticas seriam as únicas a manter a estabilidade genética em um vegetal. Segundo DEBIASI (2000), o emprego de meristemas apicais e laterais proporciona índices relativamente baixos de variação somaclonal e atribui-se ao balanço endógeno de auxina e citocinina um dos principais fatores responsáveis pela determinação do tipo de gema que irá se originar. Segundo ORELLANA et al. (1991), o emprego de concentrações de citocininas na faixa de 2,0 a 5,0 mg L<sup>-1</sup> também minimiza o aparecimento de plantas mutantes produzidas *in vitro* e PINTO et al. (1994) trabalhando com segmentos nodais de *Kielmeyera coriacea* cultivados em meio de cultura MS suplementado com concentrações acima de 8,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP, observaram a formação de brotações anormais. ISRAELI et al. (1991) relatam que o emprego de até seis subcultivos para a micropropagação da bananeira, resulta em taxas percentuais de variantes somaclonais que não ultrapassam os 5%.

Outro ponto a se destacar neste trabalho diz respeito ao rápido desenvolvimento morfogenético das gemas rizomatosas de gengibre cultivadas *in vitro*. O estabelecimento

de uma planta completa se deu em média com aproximadamente 10 dias de cultivo para formação de folhas e raízes. Este comportamento demonstra que o gengibre é uma espécie que possui alto poder regenerativo e também proliferativo quando cultivado *in vitro*.

Baseado nos relatos de SHARMA & SINGH (1997), os quais eliminaram com sucesso o *Fusarium oxysporum* F. sp. Zingiberi através do estabelecimento da micropropagação do gengibre, cultivar Himachal pradesh, e também DE LANG et al. (1987) que eliminaram nematóides através da produção de mudas de gengibre via micropropagação, tentativamente pode-se afirmar que com a metodologia utilizada neste trabalho possivelmente resultará na produção de mudas isentas de qualquer tipo de agente patogênico, principalmente daqueles que comumente se encontram nas mudas convencionalmente produzidas (fungos, nematóides e bactérias). Outra possibilidade que se pode levantar, baseado em SHARMA & SINGH (1997), os quais descrevem que a taxa proliferativa média do gengibre, cultivar Himachal pradesh se manteve por 28 meses, é que este potencial também seja refletido no material vegetal trabalhado neste experimento. Se assim ocorrer, supõe-se que, mantendo a taxa proliferativa média de 4,10 novos brotos a cada 30 dias de cultivo em meio de cultura MS+1.0 mg L<sup>-1</sup> de BAP (tratamento 3), atingir-se-á, ao final de 1 ano, cerca de 5.500.000 mudas micropropagadas de gengibre.

Em relação à aclimação das mudas micropropagadas de gengibre, observamos que a metodologia proposta foi eficiente nesta etapa da protocolação, uma vez que o índice percentual de perda na aclimação não ultrapassou os 5%.

Tratando-se de relatos *in vitro* com o gengibre, podemos encontrar respaldos comparativos para este trabalho em BHAGYALAKSHMI & SINGH (1988), WANG (1989), BALACHANDRAN et al. (1990) e MALAMUG et al. (1991), que trabalharam com a organogênese, BABU et al. (1992) e KACKAR et al. (1993) com a embriogênese somática, DEKKERS et al. (1991) descrevendo metodologias de conservação de germoplasma, SHARMA et al. (1994) com a produção de microbrotos encapsulados/sementes sintéticas e SHARMA & SINGH (1997) relatando a produção de microrizomas.

## CONCLUSÕES

O estabelecimento de um protocolo de produção massal de mudas de gengibre com alta qualidade genética e fitossanitária através de métodos biotecnológicos de micropropagação vegetal é totalmente viável e possível;

A imersão de gemas rizomatosas de gengibre em solução de hipoclorito de sódio a 3% por 10 minutos e de etanol a 70% por 2 minutos, repetindo esta operação em bancada de trabalho e em câmara de fluxo laminar, proporciona um percentual de 100% na eliminação de agentes contaminantes *in vitro*;

A utilização do meio de cultura MS isento da suplementação com reguladores de crescimento, proporciona uma ótima condição para o estabelecimento inicial de gemas rizomatosas de gengibre quando cultivadas *in vitro*.

A aclimação de gengibre em substrato de casca de arroz carbonizada e areia (1:1), sob redução solar de 50%, por um período de 60 dias, proporciona ótima condição de pré-estabelecimento a campo das mudas micropropagadas.

## AGRADECIMENTOS

Os autores expressam seus agradecimentos ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a FURB (Universidade Regional de Blumenau) pelo apoio financeiro ao trabalho.

## ABSTRACT

Cultivation of ginger (*Zingiber officinale*) grown mainly in the states of southern Brazil, is distinguished for destining a big portion of its production to the exterior market. The major problem of the culture is the production of plantlets due to pathological problems. The objective of this work was to develop an initial protocol for micropropagation of ginger. Buds from the rhizomes with approximately 0,5 cm<sup>3</sup> were submerged in aseptic solutions of sodium hypochlorite 3%(0, 5, 10 and 20 minutes) and ethanol 70%(0 and 2 minutes) and inoculated in MS median and kept at 26±2°C, photoperiod of 16 hours, 50 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> for 20 days. After obtaining and adopting the aseptic method, new roots buds had been established in the same MS medium and supplemented with BAP (0 and 1,0 mg L<sup>-1</sup>) and IAA (0 and 1,0 mg L<sup>-1</sup>). The immersion of rhizome buds for 10 or 20 minutes in solution of sodium hypochlorite 3% combined with the 2 minutes in alcohol solution 70% did not show contamination by microorganisms. The highest average number of sprouts emitted after 30 days of culture was obtained supplementing the media with 1.0 mg.L<sup>-1</sup> of BAP producing 4.10 new sprouts. In relation to the size of the sprouts, media out with growth regulators, produced an average growth of 3.13 cm of height.

Key words: Micropropagation; *Zingiber officinale*, production of plants, roots buds.

## REFERÊNCIAS

- ARIMURA, C.T.; FINGER, F.L.; TEIXEIRA, J.B. Interação ANA x BAP no desenvolvimento *in vitro* de gengibre. **Acta Horticulture**, v.569, p.289-291, 2002.
- BABU K. N.; SAMASUDEEN K.; RATNAMBAI M. J. *In vitro* plant regeneration from leaf derived callus in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.29, p.71-74, 1992.
- BALACHANDRAN S. M.; BHAT S. R.; CHANDEL K. P. S. *In vitro* clonal multiplication of turmeric (*Curcuma* spp.) and ginger (*Zingiber officinale* R.) **Plant Cell Reports**, v.8, p.521-524, 1990.
- BHAGYALAKSHMI, C.; SINGH, N. S. Meristem culture and micropropagation of a variety of ginger (*Zingiber officinale* R.) with a high yield of oleoresis. **Journal of Horticultural Science**, v.63, p.321-327, 1988.
- BIASE, L. A. **Micropropagação do abacateiro ouro verde através da cultura de segmentos nodais e calogênese a partir de discos foliares**. Porto Alegre. 1993. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- D'AMATO, F. Chromosome number in cultured and regenerated plants. Em: THORPE, T.A.(ed.). **Frontiers of plant tissue culture**. University of Calgary, Calgary, Canadá, 1978.
- DEBIASI, C. **Efeitos de antiauxinas sobre a dominância apical em gemas de bananeira *in vitro* cvs. Grand Naine (AAA), Nanicão (AAA) e Enxerto (AAB)**. Florianópolis, 2000. 100p.. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina
- 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. **Science Horticulture**, v.47, p.157-167, 1991.
- DE LANG, J.H.; WILLERS, P.; NEL, M.I. Elimination of nematodes from ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) by tissue culture. **Journal of Horticultural Science**, v.62, p.249-252, 1987.
- HOSOKI T.; SAGAWA, Y. Clonal propagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) through tissue culture. **Hort Science**, v.12, p.451-452, 1997.
- INDEN, H.; ASAHIRA, T. Micropropagation of ginger. **Acta Horticulture**, v.230, p.177-184, 1988.
- ISRAELI, Y.; REUVENI, O.; LAHAV, E. Qualitative aspects of somaclonal variations in banana propagated by *in vitro* techniques. **Science Horticulture**, v.48, p.71-88, 1991.
- KACKAR, A.; BHAT S. R.; CHANDEL K. P. S. et al. Plant regeneration via somatic embryogenesis in ginger. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.32, p.289-292, 1993.
- MALAMUG J. J. F.; INDEN, A.; ASAHIRA T. Plantlet regeneration and propagation from ginger callus. **Science Horticulture**, v.48, p.89-97, 1991.
- MURASHIGE, G.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabaco tissues culture. **Plant Physiology**, v.15, p.473-497, 1962.
- ORELLANA, P.; PEREZ PONCE, J.; AGRAMONTE, D. et al. **La micropropagacion del plátano a escala comercial en Cuba**. ACEVIV Boletín Científico, v.3, p.29-38, 1991.
- PINTO, J.E.B.P.; ARELLO, E.F.; PINTO, C.A.B.P. et al. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de *Kielmeyra coriacea*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, n.6, p.867-873, 1994.
- SHARMA T.R.; SINGH B.M.; CHAUHAN RS. Production of disease free encapsulated buds of *Zingiber officinale*. **Plant Cell Report**, v.13, p.300-302, 1994.
- SHARMA, T.R.; SINGH, B.M. High-frequency *in vitro* multiplication of disease-free *Zingiber officinale* Rosc. **Plant Cell Report**, v.17, p.68-72, 1997.
- SKOOG, F.; MILLER, C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. **Symposium of Society for Experimental Biology**, v.11, p.118-131, 1957.
- SMITH, M.K. A review of factors influencing the genetic stability of micropropagated bananas. **Fruits**, v.43, p.219-223, 1988.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Trad. Eliane Romanato Santarém et al.3.ed., Porto Alegre: Artmed, 2004.
- WANG H. *In vitro* clonal propagation of ginger sprouts. **Acta Botânica Yunnanica**, v.11, p.231-233, 1989.
- ZAFFARI, G. R.; SOLIMAN FILHO, L. F.; STUKER, H. Efeito do tamanho do explante e da quebra da dominância apical sobre a brotação das gemas laterais na produção de mudas de bananeira *in vitro*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.17, p.37-42, 1995.