

Uma alternativa para produção de mudas de gengibre (*Zingiber officinale*)

Eldo Ciano da Silva^{*ID}, Gabriella Silva Oliveira Souza Ciano^{ID}, Cristine Vanz Borges^{ID}, Mariane de Jesus da Silva de Carvalho^{ID}, Weliton Antonio Bastos de Almeida^{ID}

Faculdade Maria Milza – FAMAM. Rodovia BR-101 - Km 215 - Governador Mangabeira - BA - 44350-000 - Caixa Postal 53.

*Autor para correspondência: eldo.ciano@gmail.com

RESUMO: O objetivo desse trabalho é estabelecer uma metodologia de multiplicação *in vitro* de plantas de *Zingiber officinale* com importantes propriedades terapêuticas. As gemas foram desinfestadas e estabelecidas em meio de cultura MS, suplementado com 0,2 mg/l de ácido naftalenoacético (ANA), 3,0 mg/l de benzilaminopurina (BAP), 30 g/l de sacarose, 1g/l de carvão ativado, 6,5 g/l de ágar e pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem. Na etapa de multiplicação, os explantes foram inoculados em frascos de vidro contendo o meio de cultura MS suplementado com combinações de ANA (0,0 e 0,20 mg/l) e BAP (0,0; 1,5; 3,0, 4,5 e 6,0 mg/l), 30 g/l de sacarose e 1g/l de carvão ativado e cultivados em sala de crescimento sob condições controladas de temperatura, intensidade luminosa e fotoperíodo, sendo realizado três subcultivos com intervalo de 30 dias cada. As plantas foram avaliadas após 30 dias de cada período de cultivo através das características altura de planta (AP), número de brotos (NB), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS) e número de raízes (NR). A característica AP apresentou valores crescentes ao longo dos três subcultivos realizados. A adição de 0,2 mg/l de ANA associada a 1,5 mg/l de BAP ou a 4,5 mg/l de BAP, na fase de multiplicação, foram as concentrações que apresentam os maiores valores de NB (4,49 e 4,69, respectivamente). Em relação ao NFV, observou-se valores crescentes nos diferentes subcultivos, com média de 3,62 folhas no primeiro subcultivo e 13,73 folhas no terceiro, característica que também variou em função das concentrações de BAP, sendo as maiores médias observadas quando as plantas foram cultivadas em meio MS contendo 1,5 mg/l (9,82) e 4,5 mg/l (9,79). Por outro lado, o aumento das concentrações BAP utilizadas no meio MS ocasionou no aumento do NFS. Para o NR as maiores médias foram observadas em meio MS contendo 1,5 mg/l e 4,5 mg/l de BAP associados a 0,2 mg/l de ANA (7,97 e 7,02, respectivamente), com resultado inferior do NR em meio MS contendo 3,0 mg/l de BAP associado a 0,2 mg/l de ANA (3,35). Os resultados demonstram que as maiores médias das características avaliadas (AP, NB, NFV e NR) foram observadas no terceiro subcultivo. Além disso, para alcançar maiores valores de NB o meio de cultura MS contendo 1,5 mg/l ou 4,5 mg/l de BAP associados a 0,2 mg/l de ANA pode ser utilizado.

Palavras chaves: *Zingiber officinale*, Planta Medicinal, Cultura *in vitro*, Reguladores de crescimento.

ABSTRACT: An alternative for the production of ginger seedlings (*Zingiber officinale*). The objective of this work is to establish an *in vitro* multiplication methodology of *Zingiber officinale* plants with important therapeutic properties. The yolks were disinfested and established in MS medium supplemented with 0.2 mg/l naphthaleneacetic acid (ANA), 3.0 mg/l benzylaminopurine (BAP), 30 g/l sucrose, 1 g/l of activated carbon, 6.5 g/l of agar and pH adjusted to 5.8 before autoclaving. In the multiplication step, the explants were inoculated in glass vials containing the MS culture medium supplemented with ANA (0.0 and 0.20 mg/l) and BAP (0.0, 1.5, 3, 0, 4.5 and 6.0 mg/l), 30 g/l sucrose and 1 g/l activated charcoal and grown in a growth room under controlled conditions of temperature, light intensity and photoperiod, three subcultures with interval of 30 days each. The plants were evaluated after 30 days of each cultivation period through the characteristics of plant height (AP), number of shoots (NB), number of green leaves (NFV), number of senescent leaves (NFS) and number of roots. The AP characteristic showed increasing values throughout the three subcultures performed. The addition of 0.2 mg/l of ANA associated with 1.5 mg/l of BAP or 4.5 mg/l of BAP in the multiplication phase were the

Recebido para publicação em 04/06/2018

Aceito para publicação em 01/11/2021

Data de publicação em 09/11/2021

ISSN 1983-084X

© 2019 Revista Brasileira de Plantas Medicinais/Brazilian Journal of Medicinal Plants.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

concentrations that presented the highest values of NB (4.49 and 4.69, respectively). The NFV showed increasing values in the different subcultures, with a mean of 3.62 leaves in the first subculture and 13.73 leaves in the third, a characteristic that also varied as a function of the BAP concentrations, and the highest averages were observed when the plants were cultured in MS medium containing 1.5 mg/l (9.82) and 4.5 mg/l (9.79). On the other hand, the increase in BAP concentrations used in the MS medium caused the increase in NFS. For the NR, the highest averages were observed in MS medium containing 1.5 mg/l and 4.5 mg/l of BAP associated with 0.2 mg/l of ANA (7.97 and 7.02, respectively), with lower NR score in MS medium containing 3.0 mg/l of BAP associated with 0.2 mg/l of ANA (3.35). The results showed that the highest means of the evaluated characteristics (AP, NB, NFV and NR) were observed in the third subculture. In addition, to achieve higher NB values the MS culture medium containing 1.5 mg/l or 4.5 mg/l of BAP associated with 0.2 mg/l of ANA can be used.

Keywords: *Zingiber officinale*. Medicinal plant. *In vitro* culture. Growth regulators.

INTRODUÇÃO

O gengibre é uma das plantas medicinais mais populares e antigas do mundo, possuindo diversos estudos científicos publicados comprovando suas atividades terapêuticas anti-inflamatória, analgésica, antipirética, antioxidante, antiemética e antináusea, antimutagênica, antiúlcera, hipoglicêmica e antibacteriana, oriundas, principalmente, dos óleos essenciais presentes em sua composição (Mesomo 2013). Devido tais atividades terapêuticas, o gengibre foi incluído na Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), publicada pelo Ministério da Saúde, que consiste em uma lista contendo espécies de plantas medicinais, usadas pela sabedoria popular e comprovadas cientificamente, com potencial de gerar produtos de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS).

A micropropagação é uma das técnicas aplicadas para realização do cultivo *in vitro* de células e tecidos vegetais em meio de cultura asséptico, contendo todos os nutrientes e fatores ambientais ideais para a reprodução de uma nova planta, visando à produção em larga escala de mudas em curto espaço de tempo e em área física bastante reduzida, garantindo a fitossanidade e o vigor das mudas micropropagadas, gerando plantas de qualidade superior em comparação com as obtidas pelos métodos tradicionais (Junghans e Souza 2013).

Um dos grandes desafios na propagação convencional de gengibre está atrelado à produção de mudas que possuam elevada qualidade genética e fitossanitária, uma vez que essa forma de propagação favorece a disseminação de doenças a cada ciclo da cultura, o que pode levar a destruição total das plantações, devido, principalmente, à dispersão rápida de fungos e bactérias, além de interferir na produção dos óleos essenciais pela planta, diminuindo a eficácia medicamentosa da espécie. Tendo em vista essa perspectiva, este trabalho tem por objetivo estabelecer uma metodologia de multiplicação *in vitro* de plantas de

Zingiber officinale Roscoe, visando disponibilizar mudas para o SUS. Para isso, o trabalho visa estabelecer e multiplicar *in vitro* plantas de *Z. officinale* cultivadas no Recôncavo Baiano.

METODOLOGIA

DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO *IN VITRO*

Todos os rizomas de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), família Zingiberaceae, coletados na região do Recôncavo da Bahia no período de 2016 a 2017 para a realização do estudo foram colocados dentro de um bquer de vidro, contendo aproximadamente 100 ml de água durante 7 dias corridos. Esse procedimento foi realizado visando utilizar gemas em estágio de desenvolvimento mais avançado, sendo utilizadas apenas gemas com início de brotação, que foram reduzidas em aproximadamente 0,5 cm de tamanho após a etapa de desinfestação.

Os rizomas são a parte subterrânea do gengibre, logo, a etapa de desinfestação dos mesmos não é uma tarefa fácil, devido a elevada quantidade de patógenos presentes no solo. Com o intuito de reduzir ao máximo a contaminação oriunda do solo, os rizomas utilizados foram lavados abundantemente em água corrente, em seguida os explantes foram retirados, reduzidos a um tamanho de aproximadamente 1,0 cm e adicionados a um recipiente contendo água destilada. Logo após, os mesmos foram desinfestados em solução de hipoclorito de sódio e água em proporção 2:1 por 20 min e, posteriormente, por imersão em álcool etílico 70% por 2 min. Ao final desse processo, em câmara de fluxo laminar, os explantes foram lavados três vezes com água destilada autoclavada, reduzidos a um tamanho de aproximadamente 0,5 cm e inoculados em 10 frascos com 3 três explantes cada, contendo o meio de cultura MS (Murashige e Skoog 1962), suplementado com 0,2 mg/l de ácido naftalenoacético (ANA), 3,0 mg/l de benzilaminopurina (BAP), mais a adição de 30 g/l

de sacarose, 1g/l de carvão ativado, solidificado com 6,5 g/l de ágar e pH ajustado em 5,8 antes da autoclavagem.

Após a inoculação, os explantes permaneceram em sala de crescimento sob temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h e intensidade luminosa de $40 \mu\text{M m}^{-2}/\text{s}$. Após 30 dias de cultivo, foi avaliada a porcentagem de explantes sobreviventes e responsivos. Após o período de avaliação, os explantes sobreviventes foram introduzidos em frascos contendo o mesmo meio de cultura utilizado na fase de estabelecimento *in vitro*, durante dois subcultivos com intervalos de 30 dias visando a geração de uma quantidade suficiente de explantes para estabelecimento do experimento de micropropagação.

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO*

As brotações provenientes da fase de estabelecimento *in vitro*, após serem subcultivadas, foram transferidas para frascos de vidro contendo 30 ml do meio de cultura MS (Murashige e Skoog 1962), suplementado com combinações de ANA (0,0 e 0,2 mg/l) e BAP (0,0; 1,5; 3,0; 4,5 e 6,0 mg/l), 30 g/l de sacarose, 1 g/l de carvão ativado, 6,5 g/l de ágar e pH ajustado em 5,8. Após a inoculação, os explantes foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h e $40 \mu\text{M m}^{-2}/\text{s}$ de intensidade luminosa.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2×5 (duas concentrações de ANA e cinco concentrações de BAP), compondo um total de 10 tratamentos, com 5 repetições cada, sendo cada repetição constituída de um frasco contendo três explantes cada. As avaliações foram realizadas após 30, 60 e 90 dias, havendo subcultivos, sob as mesmas condições descritas, após as análises de 30 e 60 dias. As plantas foram avaliadas por meio das seguintes variáveis: altura de planta (cm), número de brotos, número de folhas verdes, número de folhas senescentes e número de raízes.

Os dados obtidos das avaliações dos experimentos foram submetidos a análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste F e Tukey a 5% de probabilidade. Para as concentrações dos reguladores de crescimento foram ajustados modelos de regressão polinomial, sempre que possível o ajuste de modelos significativos e com alto R^2 . As variáveis NB, NFV, NFS e NR foram transformadas para $\sqrt{x+0,5}$, visando o atendimento das pressuposições da ANOVA. As análises foram realizadas através do programa estatístico SAS – Statistical Analysis System (SAS INSTITUTE 2004).

RESULTADO E DISCUSSÃO

DESINFESTAÇÃO E ESTABELECIMENTO *IN VITRO*

No presente estudo utilizou-se uma solução diluída de hipoclorito de sódio e água (2:1) pois foi observado que essa substância em maiores concentrações eliminava toda contaminação dos explantes, entretanto provocava um efeito fitotóxico nos mesmos, ficando com uma coloração amarelada, além de não haver brotação alguma após 30 dias. Como a utilização de um tempo menor de imersão em solução de hipoclorito levava a contaminação generalizada dos explantes no meio de cultura, optou-se por manter o tempo de imersão de 20 min, conforme o trabalho de Sathyagowri e Seran (2011). Além disso diluir a solução de hipoclorito com água (na proporção 2:1) e adicionar carvão ativado ao meio de cultura para amenizar a oxidação dos explantes diminuiu as taxas de morte dos mesmos. Após 30 dias, a porcentagem de contaminação dos explantes foi de 10% e a porcentagem de explantes responsivos foi de 90%.

Debiasi et al. (2004) testaram diferentes combinações de tempos de imersão em soluções assépticas de hipoclorito de sódio 3% (0, 5, 10 e 20 min) e de etanol (0 e 2 min) e obtiveram 100% de eliminação dos agentes contaminantes de explantes de gengibre empregando 20 min de imersão em hipoclorito a 100% e etanol a 70% a 2 min em ambas. Girardi e Pescador (2010) também estabeleceram gemas de gengibre *in vitro* submetendo os mesmos ao processo de assepsia em solução de hipoclorito de sódio comercial (QBOA) por 20 min e 2 min em etanol a 70%, seguida de três lavagens consecutivas em água estéril.

MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO*

Os efeitos dos tratamentos compostos pelas combinações entre subcultivos, concentrações de ANA e concentrações de BAP, assim como os coeficientes de variação e média geral para as variáveis: altura de planta (AP), número de brotos (NB), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS) e número de raízes (NR) são apresentados na Tabela 1.

Para a característica altura de planta (AP), observou-se efeito significativo dos subcultivos, exibindo valores crescentes de AP ao longo dos três subcultivos realizados, sendo que o terceiro subcultivo apresentou uma média de AP estatisticamente superior aos demais (4,48 cm) (Figura 1). Estudos mostram que a competência para o desenvolvimento da organogênese pode ser influenciada pelo subcultivo, desencadeando alterações no crescimento e desenvolvimento de brotações (Tiwari et al. 2002; Moura et al. 2012).

TABELA 1. Resumo da análise de variância para altura de planta (AP), em cm, número de brotos (NB), número de folhas verdes (NFV), número de folhas senescentes (NFS) e número de raízes (NR) de plantas de *Zingiber officinale* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS com diferentes concentrações de ANA e BAP durante três subcultivos com intervalo de 30 dias cada.

Fonte de variação	Quadrado médio					
	GL	AP	NB	NFV	NFS	NR
Subcultivos (SUB)	2	18,94**	9,74**	35,43**	1,28**	8,80**
ANA	1	5,46 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,19 ^{ns}	0,07 ^{ns}
BAP	4	4,06*	0,22 ^{ns}	1,28**	0,61 ^{ns}	1,17**
SUB x ANA	2	0,91 ^{ns}	0,24 ^{ns}	0,23 ^{ns}	0,76**	0,16 ^{ns}
SUB x BAP	8	0,82 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,31 ^{ns}	0,30**	0,19 ^{ns}
ANA x BAP	4	3,56 ^{ns}	0,35**	0,67 ^{ns}	0,18 ^{ns}	1,34**
SUB x ANA x BAP	8	0,94 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,69 ^{ns}	0,14 ^{ns}	0,42 ^{ns}
Erro	109	1,44	0,10	0,34	0,11	0,24
CV		32,15	15,74	20,37	26,60	19,97
Média geral		3,74	3,69	8,71	1,18	5,94

**,* significativo a 1% e 5% de probabilidade pelo teste F respectivamente. ^{ns} não significativo a 5% de probabilidade.

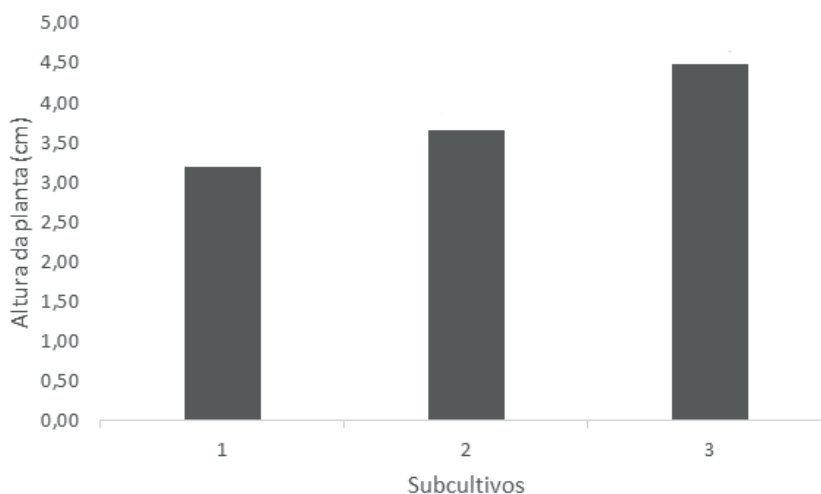


FIGURA 1. Valores médios de altura de planta (cm) de *Zingiber officinale* cultivado *in vitro* durante três subcultivos com intervalos de 30 dias cada. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Um resultado semelhante foi encontrado por Fonsenca et al. (2012), que realizaram doze subcultivos em plantas de morangueiros e encontrou a maior média de altura no 12º subcultivo. Já Oliveira (2017) observou que houve uma diminuição significativa no tamanho das brotações com o decorrer do número de subcultivos de *Cedrela fissilis* Vell., contradizendo o resultado encontrado no experimento em questão. Esses autores

ressaltam, que o tipo de explante, o meio de cultura e os reguladores de crescimento utilizados são fatores fundamentais para a indução da resposta morfogênica desejada, o que justifica as diferenças encontradas nos diferentes trabalhos.

Foi observado diferenças significativas nas alturas das plantas cultivadas em diferentes concentrações de BAP (Figura 2), sendo que, dentre as concentrações utilizadas, a de 1,5 mg/l apresentou

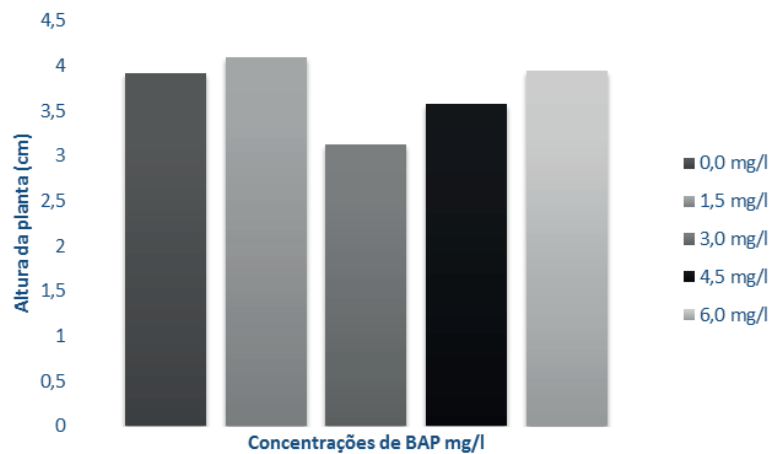


FIGURA 2. Valores médios de altura de planta (cm) de *Zingiber officinale* cultivado *in vitro* em diferentes concentrações de BAP. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste

a maior média de altura (4,09 cm), que não diferiu estatisticamente das demais concentrações, exceto da concentração de 3,0 mg/l que apresentou média de AP inferior as demais (3,13 cm). Também é possível observar uma média de altura elevada quando as plantas foram cultivadas em meio de cultura sem adição de reguladores de crescimento, o que pode estar relacionado ao efeito residual dessas substâncias nas plantas, em função da presença das mesmas na etapa de estabelecimento *in vitro* e geração dos explantes necessários para o estudo de micropropagação. Esse resultado está de acordo com o encontrado por Pavallekoodi et al. (2016), que observaram maiores alturas de plantas de gengibre em meios de cultura sem adição de reguladores e com 0,5 mg/l de BAP, em comparação com 3 e 5 mg/l do mesmo regulador.

O acréscimo de citocinina no meio de cultura nem sempre aumenta o número de brotações formadas e a altura das plantas, podendo levar à formação de desordens fisiológicas como a vitrificação dos explantes e a redução no crescimento das brotações. A menor exigência de citocinina para determinados genótipos pode estar associada aos altos teores endógenos, que aliados à adição deste regulador de crescimento ao meio de cultura, pode contribuir para um efeito decrescente na taxa de multiplicação (Radmann et al. 2009). Este efeito pode ser observado na multiplicação *in vitro* de genótipos de ameixeira, comprovado pelos trabalhos de Leontiev-Orlov et al. (2000) e Rocha (2006).

A Figura 3 descreve os valores médios do número de brotos de *Z. officinale* durante três subcultivos com intervalos de 30 dias cada, sendo

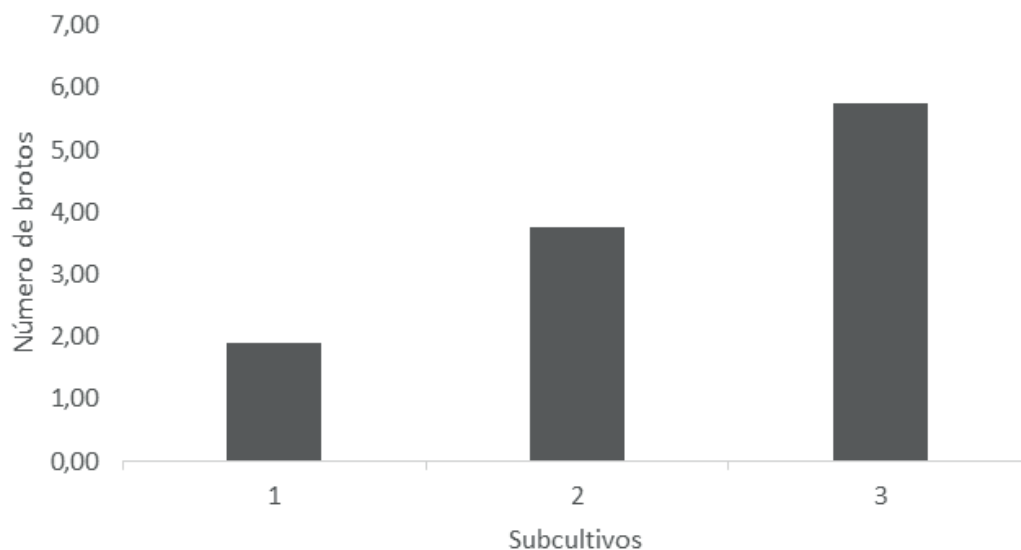


FIGURA 3. Valores médios do número de brotos de *Zingiber officinale* cultivado *in vitro* durante três subcultivos com intervalos de 30 dias cada. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

possível observar diferenças significativas no decorrer dos subcultivos, onde a média de brotação se mostrou crescente a medida que eram realizados os subcultivos, sendo assim, a menor média de NB pode ser observada no primeiro subcultivo (1,90 cm) e a maior média no terceiro subcultivo (5,74 cm). Já a Tabela 2 apresenta os valores médios do número de brotos em função das concentrações de ANA e BAP presentes no meio de cultura, ficando evidente que as maiores médias foram alcançadas quando as plantas foram cultivadas em meio de cultura MS suplementado com 0,2 mg/l de ANA associado a 1,5 mg/l de BAP (4,49), assim como quando o meio de cultura foi suplementado com 0,2 mg/l de ANA associado a 4,5 mg/l de BAP (4,69), que não diferiam estatisticamente das outras composições de meio de cultura, exceto quando ao meio de cultura foi adicionado 0,2 mg/l de ANA associado a 3,0 mg/l de BAP que apresentou resultado estatisticamente inferior as demais composições para NB (2,56). A

Figura 4 representa plantas de gengibre cultivadas em meio de cultura MS com a composição que gerou o maior NB (0,2 mg/l de ANA associado a 4,5 mg/l de BAP) após o primeiro (A) e o terceiro (B) subcultivo, evidenciando a elevada diferença do número de brotos desse tratamento entre os subcultivos.

Resultados semelhantes aos observados no presente trabalho foram encontrados por Debiassi et al. (2004) que constataram aos 30 dias de cultivo *in vitro* de *Z. officinale* que os resultados referentes às médias do número de brotações utilizando o meio de cultura MS isento de reguladores de crescimento e o meio de cultura MS com a adição de 1,0 mg/l de BAP não diferiram estatisticamente entre si, apresentando médias de 4,04 e 4,10 brotos, respectivamente

A citocinina induz a divisão celular resultando na formação dos brotos. O BAP é uma citocinina que, geralmente, em dosagens elevadas estimula o crescimento de brotações em relação aos meios

TABELA 2. Valores médios do número de brotos de plantas de *Zingiber officinale* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS com diferentes concentrações de ANA e BAP.

Concentrações de ANA (mg/l)	Concentrações de BAP (mg/l)				
	0,0	1,5	3,0	4,5	6,0
0,0	3,27 aA	3,94 aA	3,74 aA	3,25 bA	3,79 aA
0,2	3,58 aAB	4,49 aA	2,56 bB	4,69 aA	3,36 aAB

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F ($P < 0,05$) e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$). Não foi possível o ajuste de equações com significado biológico e alto R^2 para analisar as concentrações de BAP em cada concentração de ANA.

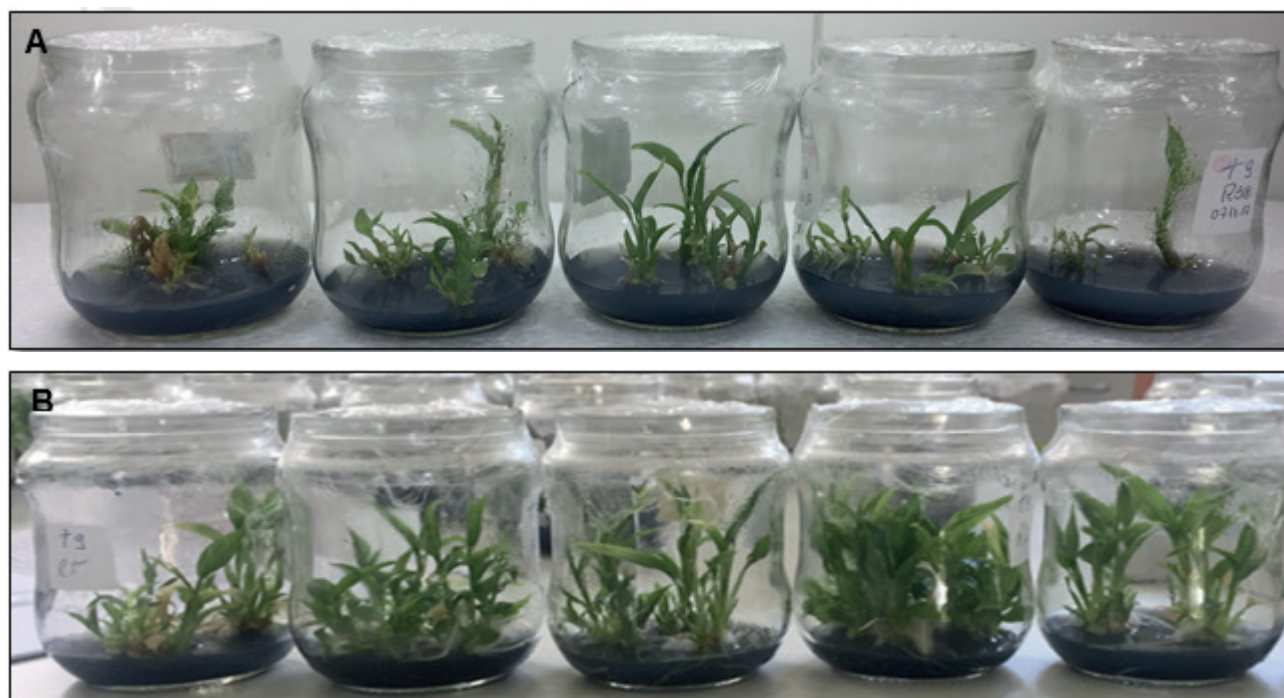


FIGURA 4. Plantas de *Zingiber officinale* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS.

de culturas com concentrações menores do mesmo (Zuraida et al. 2011). Kambaska e Santilata (2009) indicam que o BAP (2,0 mg/l) em associação com ANA (0,5 mg/l) apresenta melhores respostas para a multiplicação de gengibre (7,5 brotos por explante), o que vai de acordo com os resultados obtidos no presente estudo.

Pandey et al. (1997) destacam que o meio MS suplementado com 5 mg/l de BAP e 0,5 mg/l de ANA após 5 semanas de cultivo *in vitro* oferece a melhor resposta para a proliferação de brotos de gengibre. No entanto, outro estudo evidencia que a multiplicação dos brotos de gengibre diminui com o aumento da dose de BAP de 6 para 8 mg/l (Rout et al. 1997). Este achado também está em conformidade com Naz et al. (2009), quando relatam que a maior concentração de BAP entre as avaliadas (1 a 6 mg/l) diminui a taxa de brotação de *Curcuma longa* L. Já Abbas et al. (2011) utilizaram várias combinações de reguladores de crescimento na multiplicação *in vitro* de gengibre e alcançaram o maior número de brotações utilizando 4,5 mg/l de BAP, com um valor médio de 8 brotos por explante. Já Kavyashree (2009), afirma que os subcultivos de gengibre resultam na rápida multiplicação dos brotos e elimina a etapa de enraizamento por apresentar uma média relevante na formação dos mesmos.

Em relação ao número de folhas verdes, observou-se nos diferentes subcultivos valores significativos e crescentes, com média de 3,62 folhas no primeiro subcultivo e 13,73 folhas no terceiro (Figura 5). O número de folhas verdes também variou em função das concentrações de BAP, sendo as maiores médias observadas quando as plantas

foram cultivadas em meio MS suplementado com 1,5 mg/l de BAP (9,82) e com 4,5 mg/l de BAP (9,79), valores que não diferem estatisticamente dos observados em plantas cultivadas em outras concentrações de BAP, exceto quando as plantas foram cultivadas no meio MS suplementado com 3,0 mg/l de BAP que apresentou um valor médio de NFV estatisticamente inferior aos demais, com 6,67 folhas por planta (Figura 6).

Abbas et al. (2011), exibem resultados semelhantes aos encontrados nesse trabalho, apresentando maiores valores do número de folhas verdes na micropropagação de gengibre utilizando o meio MS suplementado com 4,5 mg/l de BAP, encontrando 15,5 folhas por broto. Entretanto, os resultados encontrados no presente trabalho estão divergentes dos obtidos por Jagadev et al. (2006), quando afirmaram que o meio MS suplementado com 3,0 mg/l de BAP e 0,4 mg/l de ANA foi ideal para obter o número máximo de formação de folhas de *Z. officinale*. Assim como esses autores, Shukla et al. (2007) destacaram que o meio MS suplementado com 3,0 mg/l de BAP produziu o maior número de folhas verdes em *Curcuma angustifolia in vitro*.

No que se refere ao número de folhas senescentes observados em plantas cultivadas em diferentes concentrações de BAP foi possível estabelecer um modelo de 1º grau crescente, com coeficiente de determinação de 90%, demonstrando que o aumento das concentrações BAP utilizadas no meio de cultura MS ocasionou um aumento na quantidade de folhas senescentes (Figura 7). A variação do número de folhas senescentes também foi observada ao longo dos três subcultivos, em

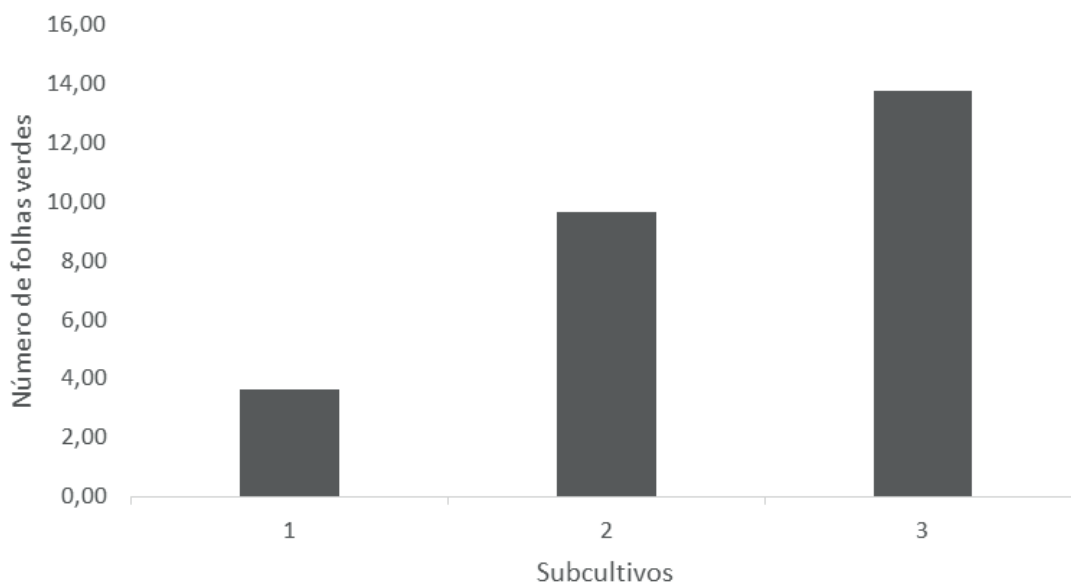


FIGURA 5. Valores médios do número de folhas verdes de plantas de *Zingiber officinale* cultivadas *in vitro* durante três subcultivos com intervalos de 30 dias cada. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

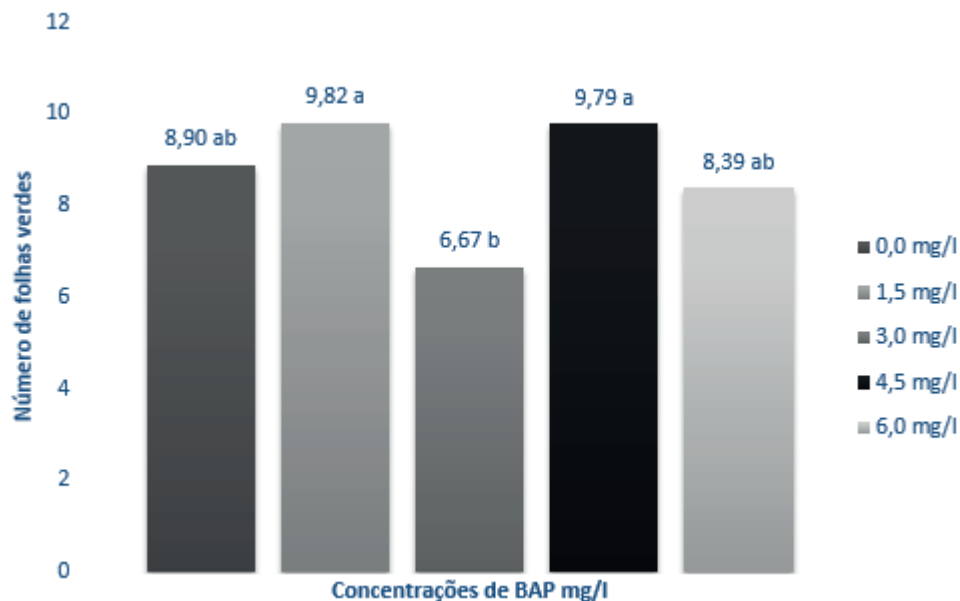


FIGURA 6. Valores médios do número de folhas verdes de plantas de *Zingiber officinale* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de BAP. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Não foi possível o ajuste de equação com significado biológico e alto R^2 .

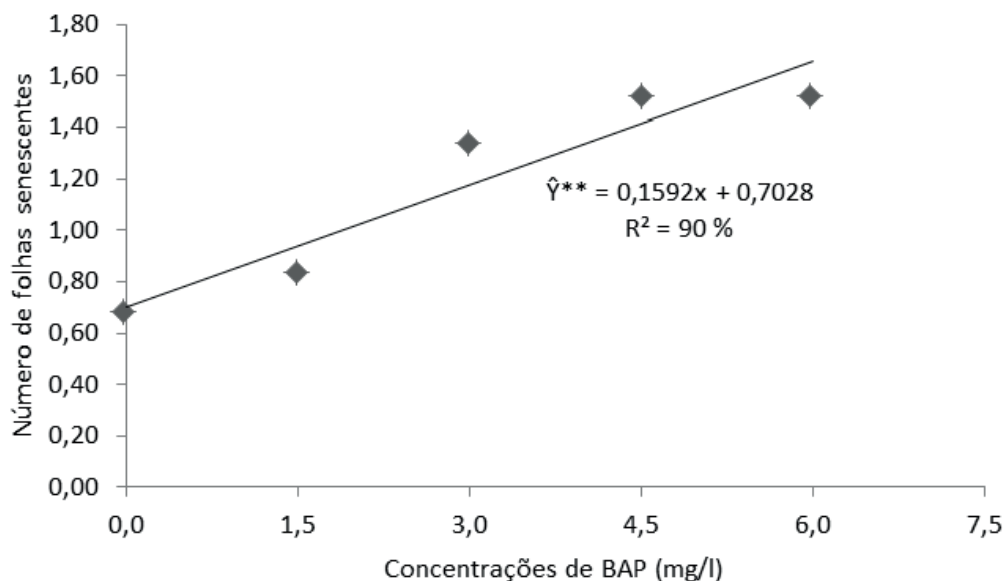


FIGURA 7. Valores médios do número de folhas senescentes de plantas de *Zingiber officinale* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de BAP.

função da ausência ou presença de ANA no meio de cultura MS (Tabela 3), com resultado inferior para o NFS no segundo subcultivo, quando as plantas foram cultivadas no meio MS suplementado com 0,2 mg/l de ANA (0,54).

A Tabela 4 apresenta os valores médios do NFS em função das concentrações de BAP ao longo de três subcultivos, sendo possível observar diferenças no NFS em função dos subcultivos apenas em plantas cultivadas em meio nutritivo com concentrações de 1,5 mg/l e de 4,5 mg/l de BAP, com resultados inferiores do NFS no segundo subcultivo

(0,31 e 0,63, respectivamente). Além disso, a variação do NFS em função das concentrações de BAP foi observada no primeiro e terceiro subcultivos, com resultados inferiores no primeiro subcultivo nas plantas cultivadas em meio de cultura sem BAP (0,47), assim como no terceiro subcultivo em plantas cultivadas meio de cultura contendo até 3,0 mg/l BAP (de 0,94 a 1,64). Candido (2013), afirma que a partir de 21 dias de cultivo *in vitro* de *Peltophorum dubium* as auxinas e citocininas passam a exercer efeito significativo na ocorrência de senescência foliar.

TABELA 3. Valores médios do número de folhas senescentes de plantas de *Zingiber officinale* em função das concentrações de ANA no meio de cultura MS ao longo de três subcultivos com intervalos de 30 dias.

Subcultivos	Concentrações de ANA (mg/l)	
	0,0	0,2
1	1,11 aA	1,28 bA
2	1,01 aA	0,54 cA
3	1,12 aB	2,18 aA

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$) e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F ($P < 0,05$).

TABELA 4. Valores médios do número de folhas senescentes de plantas de *Zingiber officinale* em função das concentrações de BAP no meio de cultura MS ao longo de três subcultivos com intervalos de 30 dias cada.

Subcultivos	Concentrações de BAP (mg/l)				
	0,0	1,5	3,0	4,5	6,0
1	0,47 aB	1,30 aAB	1,23 aAB	1,20 bAB	1,77 aA
2	0,68 aA	0,31 bA	1,17 aA	0,63 bA	1,03 aA
3	0,94 aB	0,84 abB	1,64 aB	3,14 aA	1,78 aAB

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Não foi possível o ajuste de equações com significado biológico e alto R^2 para analisar as concentrações de BAP em cada subcultivo.

Em relação ao número de raízes, houve diferenças significativas ao longo dos três subcultivos (Figura 8), onde o terceiro subcultivo apresentou maior valor médio do NR (8,18) e o

segundo subcultivo com o menor valor médio (3,93). Diferenças significativas para o NR também foram encontradas em função das concentrações de BAP no meio de cultura (Figura 9), onde as

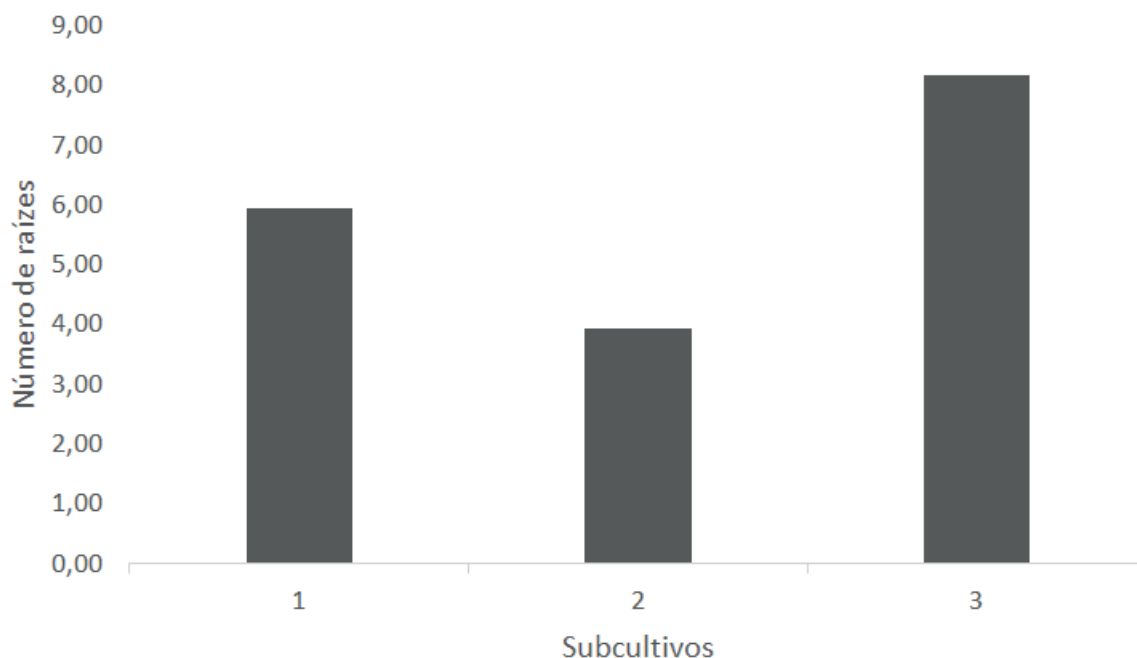


FIGURA 8. Valores médios do número de raízes de plantas de *Zingiber officinale* cultivadas *in vitro* durante três subcultivos com intervalos de 30 dias cada. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

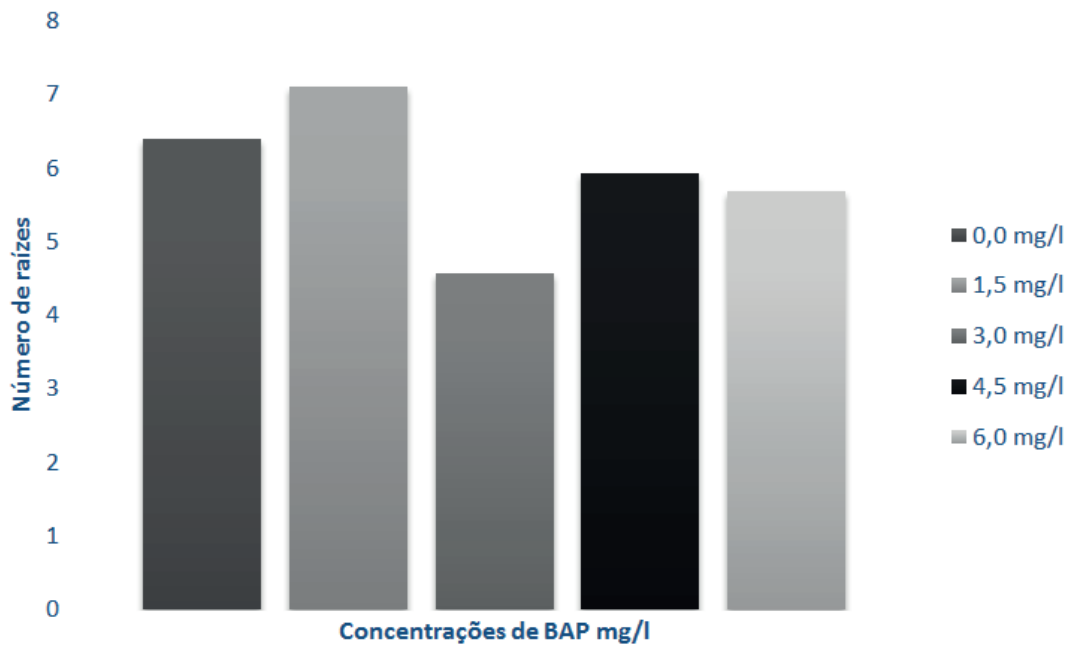


FIGURA 9. Valores médios do número de raízes de plantas de *Zingiber officinale* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de BAP. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Não foi possível o ajuste de equação com significado biológico e alto R^2 .

maiores médias do NR foram observadas em plantas cultivadas em meio nutritivo sem BAP (6,39) e em meio contendo 1,5 mg/l desse regulador (7,11), diferindo estatisticamente apenas das plantas cultivadas em meio de cultura com 3,0 mg/l de BAP, apresentando resultado inferior de NR em comparação as outras concentrações (4,56). Inden et al. (1988), relatam que altas concentrações de reguladores de crescimento reduz o alongamento e o enraizamento na micropropagação, conforme resultados observados neste trabalho. Já Thayamini (2013) afirma que a literatura revela que os melhores resultados de brotações e números de raízes são normalmente obtidos em meio MS suplementados com BAP (1 a 5 mg/l) sozinho ou em combinação com baixa concentração de ANA (0,5 mg/l).

Foram encontrados resultados significativos

nos valores médios do número de raízes na combinação das concentrações de ANA e BAP no meio de cultura (Tabela 5), sendo que as maiores médias do NR foram observadas em plantas cultivadas em meio de cultura contendo 1,5 mg/l e 4,5 mg/l de BAP associados a 0,2 mg/l de ANA (7,97 e 7,02, respectivamente), com resultado inferior do NR em plantas que foram micropropagadas em meio de cultura contendo 3,0 mg/l de BAP associado a 0,2 mg/l de ANA (3,35). Segundo Almeida et al. (2007) a adição de auxina no meio de cultura proporciona maior porcentagem, velocidade, qualidade e uniformidade de enraizamento. Segundo esse mesmo autor, a descoberta de auxinas naturais como o ácido indolacético (AIA) e de auxinas sintéticas como o ácido indolbutírico (AIB) e o ácido naftalenoacético (ANA) estimulou a maior produção

TABELA 5. Valores médios do número de raízes de plantas de *Zingiber officinale* cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS com diferentes concentrações de ANA e BAP.

Concentrações de ANA (mg/l)	Concentrações de BAP (mg/l)				
	0,0	1,5	3,0	4,5	6,0
0,0	6,62 aA	6,12 aA	5,53 aA	4,65 bA	6,86 aA
0,2	6,11 aAB	7,97 aA	3,35 bC	7,02 aAB	4,53 bBC

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste F ($P < 0,05$) e médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$). Não foi possível o ajuste de equações com significado biológico e alto R^2 para analisar as concentrações de BAP em cada concentração de ANA.



FIGURA 10. Plantas de *Zingiber officinale* completamente enraizadas e prontas para aclimação.

de enraizamento adventício em estacas caulinares e foliares e foi um marco na história da propagação vegetativa de plantas. O enraizamento do explante é geralmente espontâneo no gengibre, no entanto, é induzido em meio de cultura com auxinas ANA ou AIB ou AIA (Thayamini 2013). Abbas et al. (2011), afirmam que durante a etapa de enraizamento *in vitro* do gengibre o sistema radicular formado com tratamentos suplementados com 1 mg/l de ANA apresentou raízes vigorosas, bem desenvolvidas e amplamente ramificadas com média de 13,67 raízes por broto.

Plantas completamente enraizadas cultivadas no meio de cultura MS suplementado com 1,5 mg/l de BAP e 0,2 mg/l de ANA, que apresentaram o maior valor médio na avaliação do número de raízes, exibiram excelentes condições para serem transferidas ao processo de aclimação, conforme pode ser observado na Figura 10.

CONCLUSÃO

O fator subcultivo apresentou impacto significativo em todas as características analisadas, proporcionando as maiores médias de AP, NB, NFV e NR no terceiro subcultivo. As concentrações que apresentam maiores valores médios de número de brotos foram a adição de 0,2 mg/l de ANA associada a 1,5 mg/l de BAP ou a 4,5 mg/l de BAP no meio de cultura MS, na fase de multiplicação. Foram obtidas plantas completamente enraizadas exibindo excelentes condições para serem transferidas ao processo de aclimação.

REFERÊNCIAS

- Abbas MS, Taha HS, Aly UI, El-Shabrawi HM, Gaber ES (2011) *In vitro* propagation of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). J Genet Eng Biotechnol 9: 165-172.
- Almeida FD, Xavier A, Dias JMM, Paiva HN Eficiência Das Auxinas (AIB E ANA) no enraizamento de miniestacas de clones de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell (2007) Rev Arvore 31: 455-463
- Brasil (2009) Ministério da Saúde. RENISUS - Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Brasília: Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 27 out de 2016.
- Candido DF (2013) Cultivo *in vitro* de *peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert: multiplicação senescência foliar e calogênese. 120p. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil.
- Debiasi C, Feltrin F, Micheluzzi FC (2004) Micropropagação de gengibre (*Zingiber officinale*). Rev Bras Agrocienc 10: 61-65.
- Fonseca AP, Silva ECD, Pereira MB, Oliveira, RPD, Dornelles ALC (2013) Estabilidade fenotípica de genótipos de morangueiro submetidos a número variável de subcultivos *in vitro*. Ciênc Rural 43: 1345-1350.
- Girardi CG, Pescador R (2010) Aclimação de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) e a relação com carboidratos endógenos. Rev Bras Plantas Med 12: 62-72, 2010.
- Inden H, Asahira T, Hirano, A (1988) Micropropagation of ginger. Acta Hort 230: 177-184.
- Jagadev K, Panda N, Beura S (2006) A fast protocol for *in vitro* propagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) of a tribal district of India. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/284000435_A_fast_protocol_for_in_vitro_propagation_of_ginger_Zingiber_

- officinale_Rosc_of_a_tribal_district_of_India.> Acesso em: 10 de Jan de 2018.
- Junghans TG, Souza AS (2013) Aspectos práticos da micropropagação de plantas. 2. Ed. Brasília, DF: EMBRAPA.
- Kambaska KB, Santilata S (2009) Effect of plant growth regulator on micropropagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) cv-suprava and suruchi. J Agric Technol 5: 271-280.
- Kavyashree R (2009) An efficient *in vitro* protocol for clonal multiplication of ginger – var. Varada. Indian J Biotechnol 8: 328-331
- Leontiev-Orlov O, Rogalski M, Mossi AJ, Cansian RL (2000) 6-Benzilaminopurina (BAP) na multiplicação *in vitro* de prunáceas (*Prunus* sp.). Revis Bras Agric 6: 63-67.
- Mesomo MC (2013) Obtenção de extrato de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) usando CO₂ supercrítico e propano comprimido: cinética de extração e atividade biológica. 40p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.
- Moura LC, Titon M, Miranda NA, Moreira TP, de Oliveira MLR (2012) *In vitro* multiplication and elongation of vinhatico (*Plathymenia reticulata*). Sci For 40: 499-505.
- Murashige T, Skoog FA (1962) Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant 15: 473-497.
- Naz S, Ilyas S, Javad S, Ali A (2009) *In vitro* clonal multiplication and acclimatization of different varieties of turmeric (*Curcuma longa* L.). Pak J Bot 41: 2807-2816.
- Oliveira TR (2017) Influência dos subcultivos e da qualidade da luz na morfogênese *in vitro* em *Cedrela fissilis* Vell. (*Meliaceae*). 112p. Dissertação (Mestrado - Produção vegetal), Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Brasil.
- Pandey YR, Sagwansupyakorn C, Sahavacharin O, Thaveechai N (1997) *In vitro* propagation of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). Agric Nat Resour 31: 81-86.
- Pavallekoodi G, Sreeramanan S (2016) Micropropagation of ginger (*Zingiber officinale* var. *rubrum*) using buds from microshoots. Pak J Bot 48: 1153-1158.
- Radmann EB, Bianchi VJ, Oliveira RPD, Fachinelo JC (2009) Multiplicação *in vitro* e alongamento das brotações micropropagadas do porta-enxerto 'Tsukuba 1' (*Prunus persica* L.). Rev Bras Frutic 31: 656-663.
- Rocha PSG (2006) Propagação *in vitro* de portaenxertos do gênero *Prunus* spp. 101p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.
- Rout GR, Palai PSK (1997) *In vitro* micropropagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) interaction of growth regulators and culture conditions. Indian J Herbs Spices 20-24.
- SAS Institute. SAS user's guide: statistic: version 9.1.3. Cary: SAS Institute, 2004. 846 p.
- Sathyagowri S, Seran TH (2011) *In vitro* plant regeneration of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) with emphasis on initial culture establishment. J Med Aromat Plants 1: 195-202.
- Shukla SK, Shukla S, Koche V, Mishra SK (2007) *In vitro* propagation of tikur (*Curcuma angustifolia* Roxb.): A starch yielding plant. Indian J Biotechnol 6: 274-276.
- Thayamini, HS (2013) *In vitro* Propagation of Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) through Direct Organogenesis: A Review. Pak J Biol Sci 16: 1826-1835.
- Tiwari SK, Tiwari KP, Siril EA (2002) An improved micropropagation protocol for teak. J Plant Biotechnol 71: 1-6.
- Zuraida AR, Shahnadz AN, Harteeni A, Roowi S, Radziah CC, Sreeramanan S (2011) A novel approach for rapid micropropagation of maspin pineapple (*Ananas comosus* L.) shoots using liquid shake culture system. Afr J Biotechnol 10: 3859-3866.