



Efeitos de diferentes concentrações de ácido giberélico (AG₃) na germinação e 6-benzilaminopurina (BAP) na micropropagação de plântulas de *Zingiber spectabile* Griff.

Arlena Maria Guimarães Gato^{1*}, Simone da Silva², Flávio Freires Ferreira², Ester Neta Pinheiro³, Daniele de Carvalho Rodrigues³, Laís Medeiros de Assunção³

Submetido 11/06/2017 – Aceito 20/07/2017 – Publicado on-line 28/07/2017

Resumo

O cultivo de *Zingiber spectabile* Griff destaca-se como uma das potencialidades econômicas e de mercado de espécies de flores de corte e como importante atividade agrícola. Este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos do ácido giberélico (AG₃) na germinação e 6-Benzilaminopurina (BAP) na micropropagação de plântulas de *Zingiber spectabile*. Embriões de *Z. spectabile* foram estabelecidos *in vitro* utilizando meio MS0 (controle) e MS acrescido de AG₃ (1,0; 2,0 e 3,0 mg.L⁻¹). As plântulas produzidas foram utilizadas como doadoras de explantes para os testes com diferentes concentrações do regulador de crescimento 6-Benzilaminopurina (BAP) (1,0; 2,0 e 3,0 mg.L⁻¹). Após 30 dias de cultivo, o meio MS + 1,0 mg.L⁻¹ de AG₃ apresentou germinação de 75% dos embriões. Quanto à formação de brotos, o melhor resultado obtido foi utilizando o meio de cultivo MS + 3,0 mg.L⁻¹ de BAP (2,46). Com relação à altura das plântulas e comprimento de raízes, após 60 dias de cultivo, os diferentes tratamentos apresentaram diferenças significativas entre si e a maior altura (3,9cm) e o maior comprimento de raiz (1,7cm) ocorreram no meio de cultivo MS+2,0 mg.L⁻¹ BAP. Quanto à taxa de enraizamento, o maior percentual foi 76,7% no meio de cultivo MS + 1,0 mg.L⁻¹ de BAP e no controle (MS0). Após 60 dias de aclimatização, a sobrevivência das plantas foi 100% e quanto às variáveis analisadas, houve incremento na altura das plantas (185,7%), comprimento de raízes (197,5%), número de folhas (113,5%) e número de raízes (91,8%).

Palavras-Chave: Cultivo, explantes, aclimatização, sobrevivência.

Effects of different concentrations of gibberellic acid (AG₃) on germination and 6-benzylaminopurine (BAP) on the micropropagation of *Zingiber spectabile* Griff. *Zingiber spectabile* Griff cultivation stands out as one of the economic and market potentialities of cut flower species and as an important agricultural activity. This work aimed to evaluate the germination effects of gibberellic acid (GA₃) and of 6-Benzylaminopurine (BAP) on the micropropagation of *Zingiber spectabile* seedlings. *Z. spectabile* embryos were *in vitro* established using MS0 medium (control) and MS added to GA₃ (1.0, 2.0 and 3.0 mg.L⁻¹). The seedlings produced were used as donors of explants for tests with different concentrations of the 6-Benzylaminopurine (BAP) growth regulator (1.0, 2.0 and 3.0 mg.L⁻¹). After 30 days of culture, MS + 1.0 mg.L⁻¹ GA₃ showed 75% of embryos germination. Regarding the shoots formation, the best result obtained was using the culture medium MS + 3.0 mg.L⁻¹ BAP (2,46). In relation to seedling height and root length, after 60 days of cultivation, the different treatments presented significant differences among them, the highest height (3.9cm) and the highest root compliance (1.7cm) occurred in the culture medium MS + 2.0 mg.L⁻¹ BAP. Regarding the rooting rate, the highest percentage was 76.7% in MS + 1.0 mg.L⁻¹ of BAP culture medium and in the control (MS0). After 60 days of acclimatization, the plants survival was

¹ Pesquisadora do Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA, Coordenação de Biotecnologia Vegetal – Av. Governador Danilo de Matos Areosa, Nº 690 - Distrito Industrial – CEP 69075-351 – Manaus, AM, Brasil.

*Autor para correspondência: gatoarlina@gmail.com

² Pesquisador (a) do Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA, Coordenação de Biotecnologia Vegetal. simonydasilva@gmail.com, llfferreira05@gmail.com

³ Auxiliar Laboratorista do Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA, Coordenação de Biotecnologia Vegetal. sterpantoja@gmail.com, danyellecar@hotmail.com e laisestrelaguia@gmail.com



100% and for the analyzed variables, there was an increase in plant height (185.7%), root length (197.5%), leaf number (113.5%) and root number (91.8%).

Key-words: Cultivation, explants, acclimatization, survival.

1. Introdução

O *Zingiber spectabile* Griff, conhecido popularmente como gengibre ornamental ou shampoo, é uma espécie pertencente à família Zingiberaceae, originária da Malásia, com altura de 1,5 a 2,0 m, com hastes mais ou menos eretas, semelhantes às da cana de açúcar. As folhas são alongadas e aveludadas na face abaxial; possui inflorescências terminais, em espiga, com aspecto de cerosidade, que, à medida que se desenvolve, passa da cor amarela para a vermelha. Protegidas por suas brácteas elas contêm pequenas brácteas brancas com o centro arroxeadado LORENZI (2001). Suas brácteas em forma de cone contêm um líquido transparente que é um excelente condicionador natural de cabelo NALAWADE et al. (2003). Essa espécie também é utilizada como medicinal e para a elaboração de produtos cosméticos, além do enorme potencial ornamental, como em projetos de paisagismo ou como flores de corte FARIDAH et al. (2011).

No entanto, um dos grandes entraves da cultura está relacionado à produção de mudas com qualidade genética e fitossanitária. As mudas utilizadas pelos produtores são as propagadas convencionalmente, ou seja, vegetativamente, por rizomas. Porém, esta prática acarreta vários problemas fitossanitários, dentre eles a disseminação de doenças, principalmente por fungos, nematóides e bactérias, que podem levar à destruição total das plantações.

A cultura de tecidos é a técnica que tem sido utilizada para a propagação clonal de híbridos e espécies de plantas ornamentais, possibilitando a obtenção de plantas de alta qualidade fitossanitária, em grande escala e em curto período de tempo. A micropropagação ou propagação *in vitro* é utilizada no Brasil há pouco mais de 25 anos, com a finalidade de produção de mudas de alta qualidade genética e fitossanitária. Esta técnica tem contribuído para impedir a extinção de muitas espécies vegetais (Stancato et al., 2001). Sua utilização em

âmbito comercial já é uma realidade em diversos países do mundo, destacando-se a Holanda, França, Espanha, Japão e, mais recentemente, o Brasil IBRAFLOR (2011); SEBRAE (2011).

O meio de cultura mais utilizado em cultura de tecidos para a propagação de várias espécies vegetais é o MS MURASHIGE & SKOOG (1962), porém sua concentração de nutrientes tem sido identificada como elevada, em especial quanto ao fornecimento de nitrogênio e, neste sentido, muitas modificações têm sido sugeridas objetivando-se a maior adaptação das culturas e redução de custos.

A composição do meio de cultura é geralmente constituída por macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, sacarose, agente gelificante e reguladores de crescimento (auxinas, citocininas e giberilinas). As auxinas são utilizadas para induzir o desenvolvimento de nós, formação de calos e desenvolvimento de raízes adventícias. As citocininas estimulam a divisão celular e, em concentrações elevada induzem a formação de brotos adventícios e inibem a formação de raízes, as mais frequentes, são: cinetina (KIN), zeatina (citocinina natural), 6-benzilaminopurina (BAP ou BA) e 6-(g.g-dimetilaliminol) purina CARVALHO (1999). O papel da 6-Benzilaminopurina (BAP) na proliferação de brotos em outras espécies de Zingiberaceae, foi relatado por IKEDA e TAMBE (1989); BALANCHANDRA et al.(1990); SMITH e HAMIL (1996); ROUT et al. (2001); PANDA et al. (2007); MOHANTY et al.(2011) e ABDELMAGEED et al. (2011), quando trabalharam com *Alpinia galanga* e obtiveram média de 5,65 novos brotos.

As giberelinas participam de muitas atividades fisiológicas importantes nos vegetais, tendo efeito no crescimento, especialmente no alongamento celular (CROCOMO & CABRAL (1988). Um dos principais efeitos e aplicações das giberelinas em cultura de tecidos é o alongamento das brotações durante a



multiplicação ou, antes, do enraizamento. Outros benefícios desse regulador de crescimento são os de promover o desenvolvimento ontogênico natural dos embriões sem primórdio radicular, aqueles com primórdio e proporcionar a iniciação de uma zona radicular existente. Em alguns casos, o ácido giberélico tem sido usado para a conversão de embriões somáticos em plantas GUERRA et al (1998).

O processo de aclimatização é uma etapa importante na cultura de tecidos vegetais, pois as plantas *in vitro* se desenvolvem sob condições controladas, em ambientes fechados, sem trocas gasosas, com elevada humidade do ar, baixa intensidade de luz, e o uso de açúcares a partir do meio de cultura como uma fonte de carbono e energia (PREECE & SUTTER (1991); SCIUTTI & MORINI (1993); POSPISILOVA et al (1999). Porém, o transplante de plântulas *in vitro* e o estabelecimento completo em estufa pode ser complexo para algumas espécies (VAN HUYLENBROECK & DEBERGH (1996), ROSS-KARSTEN et al. (1998). Para a aclimatização, a seleção de um substrato adequado pode ser decisivo.

Nesse trabalho foram avaliados os efeitos do ácido giberélico (AG_3) e 6-Benzilaminopurina (BAP) na micropropagação de plântulas de *Zingiber specatibile* Griff.

2. Material e Método

O material utilizado para o início das culturas foram os frutos maduros do *Zingiber spectabile*, coletados em plantio de produtor da BR-174, km-63, Município de Presidente Figueiredo - AM. O experimento foi conduzido no laboratório de Cultivo de Células e Micropropagação do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA).

Após a extração das sementes, as mesmas foram lavadas em água corrente e detergente de origem comercial, para a remoção da mucilagem. Em seguida, as sementes foram secas em papel toalha e introduzidas em Becker contendo solução de hipoclorito de sódio (2,5%) e água destilada (1:1), onde permaneceram em agitador magnético por 10 minutos. Após agitação, as sementes foram lavadas, três vezes, em água destilada autoclavada. Em câmara de fluxo laminar, foi

realizada a extração dos embriões, que foram lavados em solução de álcool 70% por 1 minuto e posteriormente enxaguados, três vezes, em água destilada autoclavada.

Após a desinfestação, os embriões foram introduzidos em tubos de ensaio (150 x 24 mm) contendo 10 mL de meio de cultura, de composição básica segundo MURASHIGE e SKOOG (1962), sem reguladores de crescimento (MS0), suplementado com 3% de sacarose; 1,0; 2,0 e 3,0 mg.L⁻¹ de AG_3 e solidificado com 2% de phytagel. O PH foi ajustado para 5,8 e os meios foram esterilizados em autoclave a 120 °C e 1,1 Kg/cm², durante 15 minutos.

As culturas foram mantidas a 25±1°C, iluminadas com lâmpadas fluorescentes (Sylvania, Phillips/luz do dia) com intensidade de 30,0 $\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e 16 horas de fotoperíodo. Foram realizadas observações aos três, quinze e trinta dias, sendo avaliadas as porcentagens de contaminação e germinação.

Após as plântulas atingirem a altura máxima livre dos frascos de cultura (8 cm), foram utilizadas como doadoras de explantes para os testes com diferentes concentrações do regulador de crescimento 6-Benzilaminopurina (BAP) (1,0; 2,0 e 3,0 mg.L⁻¹).

Os efeitos das diferentes concentrações do regulador de crescimento foram analisados quanto à taxa de multiplicação, taxa de enraizamento, altura e número de folhas, após 60 dias de cultivo.

As plântulas foram lavadas e realizadas as avaliações quanto à altura, número de folhas, comprimento e número de raízes e, em seguida, plantadas em tubetes com o substrato, à base de casca de pinus, Topstrato® e armazenadas em casa de vegetação, com sombreamento de 70%, e sistema de irrigação por nebulização, por 30 dias. Após este período, foram transferidas para a casa de vegetação com sistema de irrigação por microaspersão, onde permaneceram por mais 30 dias.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com três tratamentos, sendo utilizados 10 explantes para cada tratamento, que foram realizados em triplicata.

Os dados obtidos sobre o desenvolvimento da planta *in vitro* quanto ao número de brotos e de gemas (taxa de



multiplicação), a altura das plantas, o número de folhas, o comprimento de raízes, o número de raízes por planta e a sobrevivência foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer, ao nível de significância de 5%. Estas análises foram efetuadas utilizando-se o *Graph Pad in Stat*, versão 3,01. Para a análise das porcentagens de germinação, contaminação e os dados obtidos após a aclimatização foi usado o teste de diferença entre porcentagens (p_1 e p_2) ao nível de 5% de significância, utilizando-se o Software Statistica for Windows™, versão 5.0 (Silva et al., 2015).

3. Resultados e Discussão

Após 30 dias de inoculação dos embriões *in vitro*, observou-se 63,7% de descontaminação, com ocorrência de 25,4% de contaminação por bactérias e 10,9% por fungos, com uma taxa de oxidação de 8,3%. NANNETTI (1994), ATEHORTUA (1997), DIAS & RODRIGUES (2001) trabalhando com ápice caulinar de heliconia obteve a contaminação de até 100% dos explantes. Já MARULANDA & ISAZA (2004), RODRIGUES (2005) e NAKANO (2008) utilizando diferentes concentrações de hipoclorito de sódio e álcool (70%) na desinfestação e o meio de cultivo MS suplementado com 2,0 mg. L⁻¹ de BAP, 0,1 mg.L⁻¹ de AIB e 0,2 mg.L⁻¹ do antibiótico Cefotaxima obteve a descontaminação de 85% dos explantes, com uma taxa de sobrevivência de 80%.

Quanto aos efeitos das diferentes concentrações de ácido giberélico na germinação de embriões de *Zingiber spectabile* Griff, após 30 dias de cultivo, o meio MS + 1,0 mg.L⁻¹ de AG₃ apresentou diferença significativa em relação aos demais tratamentos, onde se observou a germinação de 75% dos embriões seguidos do meio MS0 (70%) (Tabela 1). Estes resultados confirmam os encontrados por STEIN et al (2007) quando observou que a adição de 20 mg.L⁻¹ de AG₃ ao meio de cultivo proporcionou aumento na taxa de germinação de 82% em *Inga vera*.

Entretanto, ao utilizar o meio de cultura acrescido de 2,0 e 3,0 mg.L⁻¹ de AG₃ observou-se o menor percentual de germinação das

sementes (68,3%). Estes dados permitem supor que para a germinação de embriões dessa espécie não há necessidade de utilização de doses elevadas desses reguladores de crescimento, favorecendo a redução dos custos no processo de estabelecimento dos explantes. No entanto, AGUIAR et al. (2004) demonstra em seu estudo com embriões de *H. psittacorum* e *H. bihai* que o melhor meio de cultivo foi o suplementado com 2,8 mg.L⁻¹ de AG₃.

Tabela 1 - Percentual de germinação de embriões de *Zingiber spectabile* Griff. em meios de cultura com diferentes concentrações de AG₃.

Tratamentos	3	15	30
	Dias	Dias	Dias
MS0	0	65,0 ^b	70,0 ^b
MS + 1,0 mg.L ⁻¹ AG ₃	0	75,0 ^a	75,0 ^a
MS + 2,0 mg.L ⁻¹ AG ₃	40,0 ^a	63,4 ^b	68,3 ^b
MS + 3,0 mg.L ⁻¹ AG ₃	0	65,9 ^b	68,3 ^b

Quanto à formação de brotos, os resultados apresentados mostraram diferenças significativas entre as concentrações testadas e os melhores resultados obtidos foram com a utilização do meio de cultivo MS + 3,0 mg. L⁻¹ BAP (2,46) e o MS0 (2,33) (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeitos de diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) na brotação de *Zingiber spectabile* Griff, após 60 dias de cultivo *in vitro*.

Tratamento	Brotação	Altura (cm)
MS0	2,33 ^b	3,03 ^d
MS + 1,0 mg. L ⁻¹ BAP	1,83 ^c	3,93 ^a
MS + 2,0 mg. L ⁻¹ BAP	1,76 ^c	3,24 ^c
MS + 3,0 mg. L ⁻¹ BAP	2,46 ^a	3,33 ^b

Entretanto BALANCHANDRA et al. (1990), MUDA et al (2004) e PANDA et al (2007) apresentaram melhores resultados com o meio MS acrescido de 1,0; 3,0 e 5,0 mg.L⁻¹ de BAP ou em combinação com AIA (0,5, 1,0 e 2,0 mg.L⁻¹) ao trabalhar com micropropagação de curcuma e três variedades de *Zingiber officinalis*.

Com relação à altura das plântulas e comprimento de raízes, após 60 dias de cultivo, os diferentes tratamentos apresentaram diferenças significativas entre si. Os melhores resultados com relação à maior altura (3,9cm) (Tabela 2) e o maior comprimento de raiz



(1,7cm) (Tabela 3) foram observados com a utilização do meio de cultivo MS+1,0 mg.L⁻¹ BAP.

Em resultados obtidos por SHARMA & SINGH (1997), o melhor apresentado para o comprimento da parte aérea (6,8 cm) de *Z. officinale* foi em meio MS contendo 2,0 mg.L⁻¹ de cinetina (Kin) + 2,0 mg.L⁻¹ ácido naftalenoacético (ANA). Da mesma forma, KAMBASKA & SANTILATA (2009) relataram que, em culturas de *Zingiber officinalis*, com a combinação de MS com BAP (2,0 mg.L⁻¹) e ANA (0,5 mg.L⁻¹) obtiveram plantas com altura média de 6,2cm. No entanto, BASKARAN e JAYABALAN (2005) observaram que a cinetina (Kin) 6-furfurilamino-purina foi mais eficaz do que BAP para o comprimento da parte aérea, pois com a utilização de KIN (1,0 mg.L⁻¹) levou ao desenvolvimento de plantas com 4,10 cm de altura, enquanto com a utilização do BAP (1,0 mg.L⁻¹), o crescimento foi de 3,18 cm.

Quanto ao enraizamento (Tabela 3), observa-se que as melhores taxas foram obtidas em plantas cultivadas no meio MS0 e MS + 1,0 mg.L⁻¹ de BAP (76,7%) seguido de MS + 3,0 mg.L⁻¹ de BAP (66,7%) e o menor percentual foi com a utilização de MS + 2,0 mg.L⁻¹ de BAP (63,3%). Estes resultados confirmam as informações prestadas por RIBEIRO et al (2012) quando obteve um bom desempenho na indução do sistema radicular em plantas de *Zingiber spectabile* cultivadas *in vitro*, quando comparou os resultados obtidos em MS (12%) com outros meios de cultivo (Knudson + vitaminas + aminoácidos (5%); Knudson (5%); Pierik (6%) Hoagland + sacarose (6%); Hoagland + sacarose + vitaminas + aminoácidos (10%).

O meio MS é conhecido por ser um meio altamente concentrado, tendo em sua composição altas concentrações de nitrogênio (840,90 mg.L⁻¹), cálcio (119,98 mg.L⁻¹), manganês (1,08 mg.L⁻¹) e zinco (1,96 mg.L⁻¹). Por essas atribuições este meio tem bom desempenho na indução do sistema radicular de plantas de sorvetão cultivadas *in vitro*, pois esses nutrientes são requeridos no processo de formação de raízes.

Tabela 3 - Efeitos de diferentes concentrações de 6-Benzilaminopurina (BAP) no enraizamento de *Zingiber specatabile* Griff, após 60 dias de cultivo *in vitro*.

Tratamento	Taxa de Enraizamento (%)	Comprimento Radicular (cm)
MS0	76,7 ^a	1,56 ^b
MS + 1,0 mg. L ⁻¹ BAP	76,7 ^a	1,70 ^a
MS + 2,0 mg. L ⁻¹ BAP	63,3 ^b	1,23 ^d
MS + 3,0 mg. L ⁻¹ BAP	66,7 ^b	1,53 ^c

Tabela 4 – Avaliações da altura (cm), comprimento de raiz (cm), número de folhas e taxa de enraizamento (%), após 60 dias de aclimatização em casa de vegetação.

Número Dias	Altura da Planta (cm)	Comprimento de Raízes (cm)	Número de Folhas	Número de Raízes
1	3,5	4,0	3,7	6,1
60	10,2	11,9	7,9	11,7
Incremento (%)	185,7	197,5	113,5	91,8

Observou-se que os resultados obtidos nesse estudo, com a utilização de embriões *in vitro*, contrapõem-se aos resultados obtidos com outros tipos de explantes. Sugere-se a realização de mais estudos quanto à utilização de diferentes tipos de explantes para início das culturas *in vitro* de *Zingiber spectabile* Griff.

Após 60 dias de aclimatização, observou-se 100% de sobrevivência das plantas de *Zingiber spectabile*. Esse resultado assemelha-se ao obtido por SILVA et al (2006), trabalhando com essa mesma espécie utilizando substrato com vermicomposto, também obtiveram 100% de sobrevivência das plantas aclimatizadas. Quanto às outras variáveis analisadas, a média de altura das plantas foi de 10,2cm, com 91,8% de enraizamento, cujas raízes apresentaram, em média, 11,9cm e o número médio de folhas foi de 7,9 por planta (Tabela 4). Tal desempenho pode estar associado às características desse substrato, como a boa porosidade, pois é composto de casca de pinus, turfa, e vermiculita acrescido de

superfosfato simples e nitrato de potássio, que proporcionam condições favoráveis para o melhor desenvolvimento das mudas, além do controle do ambiente interno em casa de vegetação, pois segundo COSTA (2001), em condições de casa de vegetação é possível proporcionar maior controle em relação à temperatura, umidade relativa, radiação solar, nível de CO₂, sombreamento artificial e nutrição de plantas.

Quanto ao incremento obtido, após 60 dias de aclimatização, pode-se observar que as variáveis estudadas, ou seja, altura, comprimento de raízes, número de folhas e a taxa de enraizamento alcançaram percentuais que variaram de 91,8 a 197,5% (Figura 1).

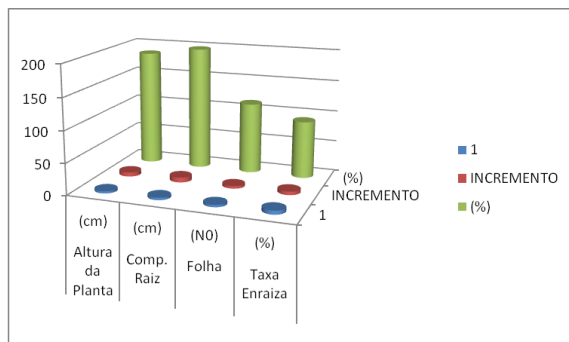


Figura 1 – Percentual de incremento das variáveis: Altura, comprimento de raiz, número folhas e taxa de enraizamento.

4. Conclusão

O meio de cultivo MS + 1,0 mg.L⁻¹ de AG₃ foi o mais eficiente quanto à germinação dos embriões;

O efeito do BAP, nas concentrações testadas, influenciou tanto na indução de brotos quanto na altura e comprimento de raízes de *Zingiber spectabile*;

O substrato Topstrato® foi eficiente na aclimatização das plântulas, proporcionando a sobrevivência 100% das mudas.

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. O(s) autor (es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referencias Bibliográficas

ABEDELMEGEED, A. H. A.; FARIDAH, Q. Z.; NORHANA, F. M. A.; JULIA, A. A. Micropropagation of *Etilingera elatior* by using axillary bud explants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 13, 2011.

ATEHORTUA, L. **Heliconias. A new challenge for the Colombian floricultural industry Biotechnology and Development**. Monitor. Amsterdam, v. 31, p 20-21.1997.

BALACHANDRAN, S. M.; BHAT, S. R.; GHANDEL, K. P. S. In vitro clonal multiplication of tumeric (*Curcuma spp*) and ginger (*Zingiber Officinale* Rosc). **Plant cell Report**, vol. 8, p. 521-524, 1990.

BASKARAN, P. & JAYBALAN, N. An improved protocol for adventitious shoot regeneration and plant formation in *Psoralea corylifolia*. **Scientia Horticulturae**, v. 123, n. 2, p. 283-286, 2009.

CARVALHO, J. M. F. C. de. **Técnicas de micropropagação**, Campina Grande-PB, Embrapa Algodão, 39 p. 1999.

CROCOMO, O. J. & CABRAL, J. B. **A biotecnologia no melhoramento de plantas tropicais**. Brasília, DF: Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior. 39 p. 1988.

COSTA, E. **Avaliação da produção de alface em função dos parâmetros climáticos em casas de vegetação com sistema hidropônico nos períodos de outono e inverno**. 2001. 144p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

DIAS, M. A. RODRIGUES, P. H. V. Fontes de explantes e contaminantes isolados em cultivo in vitro de helicônia. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Campinas. v. 7, n. 2, p. 165-168. 2001.

FARIDAH, Q. Z., ABDELMEGEED, A. H. A., JULIA, A.A., NORHAFIZAH, R. Efficient in vitro regeneration of *Zingiber zerumbet* Smith (a variable medicinal plant) plantlets from bud



explants. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n. 46, p. 9303-9308. 2011.

GUERRA, M. P. Embriogênese somática e sementes sintéticas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). Cultura de tecidos e transformações genéticas de plantas. Brasília, DF: **EMBRAPA/CBAB**, p. 533-568. 1998.

KAMBASKA, K. B. & S. SANTILATA. Effect of plant growth regulator on micropropagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) cv-Suprava and Suruchi. **Journal of Agricultural Technology** 5: 271-280. 2009.

IKEDA, I.R. & TAMBE, M. *In vitro* subculture applications for ginger. **Journal of Horticultural Science**, v. 24:142-143.1989.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. Plantas Ornamentais no Brasil. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**, 2001.2088p.

MOHANTY, S., PANDA, M. K., SAHOO, S., NAYAK, S. Micropropagation of *Zingiber rubens* and assessment of genetic stability through RAPD and ISSR markers **Biologia Plantarum**, v. 55, n. 1, p. 16-20. 2011.

MARULANDA, M. L. & ISAZA, L. Estabelecimento in vitro de Heliconias com flores de produção massiva. **Scientia et Technica**, ano 10, n. 26, p. 0122-1791. 2004.

MOREIRA, R. A.; FILIPE, A.; Rodrigues, L.; MONFORT, E. F.; MARINES, F. P. PASQUAL, M. Diferentes meios de cultura no crescimento in vitro de sorvetão. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Pernambuco. v. 7, n. 3, p. 409-413. 2012.

MUDA M. A.; KHALID, N.; IBRAHIM, H. **Malaysian Journal of Science**, v. 23, n. 2, p. 7-10. 2004.

MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-479, 1962.

NALAWADE, S. M., SAGARE, A.P., C. Y. Lee, KAO TSAY, H. S. Biotechnology on tissue culture of Chinese medicinal plant resources in Taiwan and

their sustainable utilization. **Botanical Bulletin of Academia Sínica**. 44: 79-98. 2003.

NAKANO, V. A. *Micropropagação de espécies de heliconia, caracterização morfológica e identificação molecular de bactérias contaminantes*. 2008. 81 f. **Dissertação. (Mestrado em Ciências: biologia na agricultura e no ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP.**

NANNETTII, D. C. **Utilização da cultura de tecidos vegetais na micropropagação de Heliconia sp.** 1994. 106 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras-MG.

PANDA, M. K., MOHANTY, S., SUBUDHI, ENKETESWAR, ACHARYA, L., NAYAK, S. Assessment of genetic stability of micropropagated plants of *Curcuma longa* L. by cytophotometry and RAPD analysis. **International Journal of Integrative Biology**. 1: 189-195. 2007.

POSPISILOVA, J., TICHA, I., KADLE, P., HAISEL, D. PLZAKOVA, S. Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. **Biologia Plantarum**, v. 42, p. 481-497, 1999.

PREECE, J. E. & SUTTER, E. G. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: Debergh, P. C.; Zimmerman, R.H. **Micropropagation, technology and application**. London: Kluwer Academic. p. 71-93.1991.

RIBEIRO, M. de N. O. PASQUAL, M., VILLA, F., PIO, L.A. S., HILHORST, H.W., M. *In vitro* seed germination and seedling development of *Annona crassiflora* Mart. **Scientia Agricola** (Piracicaba, Braz.), v. 66, n. 3, p. 410-413. 2009.

RIBEIRO, T. R.; ALMEIDA, E. F. A.; FRAZÃO, J. E.; CARVALHO, J. G. Bastão do Imperador. In: Paiva, P. D. O.; Almeida, E. F. A. (ED). **Produção de flores de corte**. Lavras: UFLA, p.90-103. 2012.

ROSS-KARTENS, G.S. ROSS-KARSTENS, G.S.; EBERT, G.; LUDDERS, P. Influence of *in vitro* growth conditions on stomatal density, index and aperture of grape, coffee and banana plantlets.



Plant Tissue Culture and Biotechnology, v. 4, p.21-27, 1998.

ROUT, G.R. PELAI, S. K.; DAS, I. Effect of growth regulator and culture conditions on shoot multiplication and rhizome formation in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) *in vitro*. **Cellular e Developmental Biology - Plant.**, v. 37, p. 814-819, 2001.

SCIUTTI, R. & MORINI, S. Effect of relative humidity *in vitro* culture on some growth characteristics of a plum rootstock during shoot proliferation and rooting and on plantlet survival. **Advances in Horticultural Science**, v. 7, p.153-156, 1993.

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.

SILVA, S., FERREIRA, F. F. & GATO, A. M. G. Efeitos de diferentes concentrações de 6-Benzilamiopurina no cultivo *in vitro* de *Manihot esculenta* Crantz. **Scientia Amazonia**, v. 4, n. 1, p. 105-111, 2015.

SILVA, A. B. da, PASQUAL, M., MACIEL, A. L. DE R., DUTRA, L. F. BAP e substratos na aclimatização de plântulas de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lood Hien) provenientes de cultura de

tecidos. **Ciência e Agrotomologia**, Lavras, v. 27, n. 2, p. 255-260. 2003.

SILVA, A. L. L. Aclimatização de clones de *Dyckia maritima* em diferentes substratos-Bromeliaceae. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas-RS, v. 12, n. 4, p. 495-498, 2006.

SMITH, M. K. & HAMIL S. D. Field evaluation of micropropagated ginger in subtropical Queensland. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 36, p. 347-354. 1996.

STANCATO, G. C.; BEMELMANS, P. F.; VEGRO, C.L.R. Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes *in vitro* e sua viabilidade econômica: estudo de caso. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 7, n. 1, p. 25-33, 2001.

STEIN, V. C. PAIVA, R.; SOARES, F. P. S.; NOGUEIRA, R. C.; EMIRICH, E. Germinação *in vitro* e *ex vitro* de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T. D. Penn. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 1702-1708, 2007b.

VAN HUYLENBROECK, J.M. & DEBERGH, P.C. Impact of sugar concentration *in vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during *ex vitro* acclimatization of *Spathiphyllum* plantlets. **Physiologia Plantarum**, v. 96, p. 298-304, 1996.