

EMBRYOGENIC INDUCTION OF TORCH GINGER (*Etilingera elatior*) CALLUS

INDUCCIÓN EMBRIOGÉNICA EN CALLO DE JENGIBRE ANTORCHA (*Etilingera elatior*)

Gabriellen de M. Gomes-Dias^{1*}, Filipe Almendagna-Rodrigues¹, J. Dória Rodrigues-Soares¹,
Moacir Pasqual¹, A. Cristina Portugal- Pinto de Carvalho²

¹Federal University of Lavras (UFLA), Departamento of Agriculture, Postal Office 3037, 37200-000, Lavras- MG, Brazil. (gabriellen@gmail.com). ²Embrapa Tropical Agroindustry (CNPAT), Dra. Sara Mesquita Street, 2270, 60511-110, Fortaleza-CE, Brazil.

ABSTRACT

Torch ginger *Etilingera elatior* (Jack) R.M. Smith is a tropical herb-like, rhizome-like and perennial plant that possesses inflorescences that are both pretty and showy at different colour shades, and have a great visual appeal. Producing seedlings at a high enough level when done conventionally by the division of tussocks, has high costs and phytosanitary problems. The objective of this study was to evaluate the induction of somatic embryogenesis and its potential for subsequent plant regeneration in torch ginger. Rhizomes, leaves and roots from the seedlings grown *in vitro* were used as explant segments. The different explants were cultured on MS medium supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose, and it was solidified with 5.5 g L⁻¹ of agar. The effect of 2.4-D and picloram concentrations of 0.0, 1.0, 2.0 and 4.0 mg L⁻¹ was studied. A structural analysis was performed by scanning electron microscopy (SEM). Cytochemical analysis were performed to detect nucleolus with carmine acetic, starch with lugol and lipids with Sudan III, and a flow cytometry analysis to verify the stability of ploidy in the callus. Results indicate that the culture medium with 2.4-D yielded the induction of embryogenic callus with the characteristics of the rhizome segments of the explant. Regarding the ultrastructural analysis of embryogenic callus characteristics, the cells showed a similar isodiametric form as somatic embryos in the globular stage and cytochemical analysis. The presence of callus cells in pro-embryogenic explants containing each of the regulators was confirmed. In the cytometry analysis, the average DNA content of callus ranged from 5.43 to 10.15 pg, and the coefficients of variation varied between 0.3 to 2.26. Callus induced with 2.4-D showed 86 % stability, and with picloram was 64 %. The callus formation was more evident after application of 2.4 D. This is the first

RESUMEN

El jengibre antorcha *Etilingera elatior* (Jack) R. M. Smith es una planta tropical perenne, similar al rizoma, que tiene inflorescencias que son bellas y llamativas, de diferentes colores y matices y de un gran atractivo visual. La producción de plántulas en un nivel lo suficientemente alto cuando se hace convencionalmente utilizando la división de matas tiene altos costos y problemas fitosanitarios. El objetivo de este estudio fue evaluar la inducción de la embriogénesis somática y su uso potencial para la reproducción posterior de plantas de jengibre antorcha. Los rizomas, hojas y raíces de las plántulas cultivadas *in vitro* se utilizaron como segmentos de explantes. Los diferentes explantes se cultivaron en un medio MS al que se le agregaron 30 g L⁻¹ de sacarosa y fue solidificado con 5.5 g de agar L⁻¹. Se estudió el efecto del 2.4-D y picloram en concentraciones de 0.0, 1.0, 2.0 y 4.0 mg L⁻¹. El análisis estructural se llevó a cabo por microscopía electrónica de barrido (SEM). Se realizaron análisis citoquímicos para detectar núcleos con carmín acético, almidón con lugol y lípidos con Sudán III; y un análisis de citometría de flujo para verificar la estabilidad de la ploidía en el callo. Los resultados indicaron que el medio de cultivo con 2.4-D produjo la inducción de callo embriogénico con las características de los segmentos de rizomas del explante. En el análisis ultraestructural de las características del callo embriogénico, las células mostraron una forma isodiamétrica similar a embriones somáticos en etapa globular y análisis citoquímico. Se confirmó la presencia de células de callo en explantes pro-embriogénicos conteniendo cada uno de los reguladores. En el análisis de citometría, el contenido medio de ADN del callo varió de 5.43 a 10.15 pg, y los coeficientes de variación oscilaron entre 0.3 y 2.26. El 2.4-D indujo callos con estabilidad de 86 %, y con picloram fue 64 %. La formación de callo fue más evidente después de aplicar 2.4-D. Éste es el primer estudio del potencial embriogénico de células del jengibre antorcha, y mostró que el 2.4-D indujo la formación de callo con mayor contenido de almidón y genéticamente estable.

* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: February, 2013. Approved: February, 2014.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 48: 173-184. 2014.

study of embryogenic potential in cells of the torch ginger, and showed that 2,4-D induced callus with higher starch content and genetically stable.

Keywords: Zingiberaceae, *Etilingera elatior*, viability.

INTRODUCTION

The main species of tropical flowers in Brazil belong to the families Araceae, Heliconiaceae, Musaceae and Zingiberaceae; they are found either as natural vegetation or in conventional plantations in tropical America, Asia and the western Pacific (Assis *et al.*, 2002). Among these plants, there is propagation and cultivation of the *Etilingera* genus that belongs to the Zingiberaceae family; in particular, the torch ginger (*Etilingera elatior* (Jack) R. M. Smith) and is propagated by rhizomatous clumps division or seeds. This vegetative propagation spread pests and diseases causing production problems (Lins and Coelho, 2004).

Somatic embryogenesis is an *in vitro* propagation technology with promising results for improving plant cloning. It has elicited interest, especially from research institutions and Brazilian companies with advanced breeding and cloning programs (Titon *et al.*, 2007). Somatic embryogenesis is an important system for vegetative propagation in which somatic cells can generate embryos due to totipotency of plant cells. This process provides a useful experimental model to investigate the events of plant embryogenesis; besides, it is one of the most important techniques for mass propagation of elite or genetically modified plants (Santos *et al.*, 2002). *In vitro* regeneration is achieved via organogenesis (Yunus *et al.*, 2012); however, in the literature reviewed no references were found about somatic embryogenesis in torch ginger.

The objective of this study was to evaluate different types of explants and growth regulators concentrations in relation to the potential for callus induction in torch ginger (*Etilingera elatior* (Jack) R. M. Smith) var. Porcelain.

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out in the Laboratory of Plant Tissue Culture of the Department of Agriculture (DAG) at the Federal University of Lavras (UFLA), between January to July 2010.

Palabras clave: Zingiberaceae, *Etilingera elatior*, viabilidad.

INTRODUCCIÓN

Las principales especies de flores tropicales en Brasil pertenecen a las familias Araceae, Heliconiaceae, Musaceae y Zingiberaceae, que se encuentran como vegetación natural o en las plantaciones convencionales de las zonas tropicales de América, Asia y el Pacífico occidental (Assis *et al.*, 2002). Entre estas plantas, crece y se propaga el género *Etilingera* que pertenece a la familia Zingiberaceae, en particular, el jengibre antorcha (*Etilingera elatior* (Jack) R. M. Smith) y se propaga por la división de matas rizomatosas o por semilla. Esta propagación vegetativa disemina plagas y enfermedades, causando problemas de producción (Lins y Coelho, 2004).

La embriogénesis somática es una tecnología de propagación *in vitro* con resultados prometedores para mejorar la clonación de las plantas. Ha suscitado interés, especialmente de instituciones de investigación y empresas brasileñas con programas avanzados de mejoramiento y clonación (Titón *et al.*, 2007). La embriogénesis somática es un sistema importante para la propagación vegetativa en la que las células somáticas pueden generar embriones debido a la totipotencia de las células vegetales. Este proceso proporciona un modelo experimental útil para investigar los eventos de la embriogénesis de la planta; además, es una de las técnicas más importantes para la propagación masiva de las plantas élite o genéticamente modificadas (Santos *et al.*, 2002). La regeneración *in vitro* se logra a través de la organogénesis (Yunus *et al.*, 2012.). Sin embargo, en la literatura revisada no se encontraron referencias sobre la embriogénesis somática en jengibre antorcha.

El objetivo de este estudio fue evaluar diferentes tipos de explantes y concentraciones de reguladores del crecimiento en relación con el potencial de inducción de callos en jengibre antorcha (*Etilingera elatior* (Jack) R. M. Smith) var. Porcelana.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejido Vegetal del Departamento de Agricultura (DAG) de la Universidad Federal de Lavras (UFLA), de enero a julio de 2010. Las plantas se establecieron *in vitro* a partir de meristemos de brotes

The plants established *in vitro* from shoot meristems of torch ginger var. Porcelain. These were provided by the Brazilian Unit of Agricultural Research (EMBRAPA), located in Fortaleza, Ceará. These plants were subcultured monthly for 60 d under aseptic conditions on MS medium (Murashige and Skoog, 1962) containing 2.5 mg L⁻¹ of 6-benzilamopurine (BAP) (SIGMA®) solidified with agar (5.5 g L⁻¹). The cultures were maintained in a growth chamber at 25±2 °C, irradiance of 36 mmol m⁻² s⁻¹ and for a 16-h photoperiod.

Leaf segments (0.7 cm²), root segments (1.0 cm) and rhizome segments (0.5 cm) were removed from the micropropagated plants, and the rhizome was cut longitudinally into three segments corresponding to positions R1 (apical), R2 (middle) and R3 (basal). The segments were transferred to test tubes containing MS medium supplemented with four concentrations of 2.4-D (SIGMA®) and four of picloram (SIGMA®) (0.0, 1.0, 2.0 and 4.0 mg L⁻¹). The cultures were incubated in a growth chamber at 25±2 °C in complete darkness. At 120 d after inoculation, the percentage of callus formation was measured in all treatments.

The experimental design was completely randomized with 40 treatments (eight auxin concentrations and five types of explants) and five replicates per treatment (two test tubes each). The data were statistically analyzed for variance and regression using the program SISVAR (Ferreira, 2011).

Additionally a scanning electron microscopy (SEM) study, a cytochemical test and a ploidy study level by flow cytometry were performed on each treatment at 120 d. For the SEM study, the callus tissue was fixed in Karnovsky (Karnovsky, 1965), fixative solution (pH 7.2) for 24 h under refrigeration (4 °C). Then, samples were washed in 0.056 M cacodylate buffer (three times) for 10 min each and postfixed in 1 % osmium tetroxide in 0.05 M cacodylate (SIGMA®) buffer for 4 h at room temperature (20 °C). Afterwards, the samples were washed three times in distilled water and dehydrated in a serial of acetone solutions (25, 50, 75 and 90 %) for 10 min each and three times in 100 % acetone for 1 min. The samples were dried in a critical point drier using an Instrument Bal-Tec (model CPD 030 Critical Point Dryer, Germany) and gold coated. The specimens were observed with SEM (LEO Evo 040, Germany), operating at 10 and 20 kV, at the Laboratory of Electron Microscopy and Ultrastructural Analysis (LME) of the Plant Pathology Department (UFLA).

For the cytochemical analysis callus fragments of 100 mg were double stained with acetic carmine blue Evans (positive reaction indicates embryogenic potential of cells), lugol for starch and Sudan III for lipids, according to Steiner *et al.* (2005). The photomicrographs were made with a digital camera EIREKAM 3.0 (effective pixels 2048 x 1536, USA) coupled to a light microscope (Olympus BX 60).

de jengibre antorcha. La variedad Porcelana fue proporcionada por la Unidad de Investigación Agropecuaria de Brasil (EMBRAPA), que se encuentra en Fortaleza, Ceará. Estas plantas se subcultivaron mensualmente durante 60 d en condiciones asépticas en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) que contiene 2.5 mg L⁻¹ de 6-benzilamopurine (BAP) (SIGMA®) solidificado con agar (5.5 g L⁻¹). Los cultivos se mantuvieron en una cámara para crecimiento a 25±2 °C, irradiación de 36 mmol m⁻² s⁻¹ y durante un fotoperíodo de 16-h.

Los segmentos de hoja (0.7 cm²), de raíz (1.0 cm) y de rizomas (0.5 cm) fueron retirados de las plantas micropropagadas y el rizoma se cortó longitudinalmente en tres segmentos correspondientes a las posiciones R1 (apical), R2 (centro) y R3 (basal). Los segmentos se trasladaron a tubos de ensayo que contenían medio MS complementado con cuatro concentraciones de 2.4-D (SIGMA®) y cuatro de picloram (SIGMA®) (0.0, 1.0, 2.0 y 4.0 mg L⁻¹). Los cultivos se incubaron en una cámara para crecimiento a 25±2 °C en oscuridad total. A los 120 d después de la inoculación, se midió el porcentaje de formación de callo en todos los tratamientos.

El diseño experimental fue completamente al azar con 40 tratamientos (ocho concentraciones de auxina y cinco tipos de explantes) y cinco repeticiones por tratamiento (dos tubos de ensayo de cada uno). Los datos se analizaron estadísticamente para la varianza y la regresión con el programa SISVAR (Ferreira, 2011).

Además en cada tratamiento se realizó un estudio de microscopía electrónica de barrido (SEM), un examen citoquímico y uno del nivel de ploidía por medio de la citometría de flujo a los 120 d. Para el estudio SEM, el tejido de callo se fijó en la solución de fijación Karnovsky (Karnovsky, 1965) (pH 7.2) durante 24 h en refrigeración (4 °C). Luego las muestras se lavaron en un amortiguador de cacodilato 0.056 M (tres veces) durante 10 min cada uno y se fijaron posteriormente en tetróxido de osmio al 1 % en un amortiguador de cacodilato 0.05 M (SIGMA®) durante 4 h a temperatura ambiente (20 °C). Después, las muestras se lavaron tres veces en agua destilada y se deshidrataron en una serie de soluciones de acetona (25, 50, 75 y 90 %) durante 10 min cada una, y tres veces en acetona al 100 % durante 1 min. Las muestras se secaron en un secador de punto crítico con un equipo Bal-Tec (modelo CPD 030 de Secador de Punto Crítico, Alemania) y recubrieron con oro. Las muestras se observaron con SEM (LEO Evo 040, Alemania), operando a 10 y 20 kV, en el Laboratorio de Microscopía Electrónica y Análisis Ultraestructural (LME) del Departamento de Patología Vegetal (UFLA).

Para el análisis citoquímico los fragmentos de callo de 100 mg fueron doblemente teñidos con azul carmín acético de Evans (la reacción positiva indica el potencial embriogénico de las células), lugol para el almidón y Sudán III para los lípidos,

The determination of DNA amount and ploidy level was performed in three replicates of 300 mg from callus of each treatment. The samples were crushed in a petri dish containing 1 mL of extraction buffer LB01 (Dolezel *et al.*, 1989). A leaf weight of pea (*Pisum sativum*) was used as reference standard quantity of DNA=9.9 pg. Histograms were obtained on a FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson, USA) with the Cell Quest software (Dickinson, 1998). The amount of DNA (pg) was calculated with the equation: Amount of DNA (pg) = (G1 peak position of sample / G1 peak position pea (*Pisum sativum*)) × 9.09. The statistical analysis of the data was performed using WinMDI 2.8 software (Trotter, 2000).

RESULTS AND DISCUSSION

In the absence of growth regulators, there was no callus in any of the five tested explants but the rhizomes formed whole plants and lateral shoots (Figure 1 D). Most species require growth regulators to initiate the process of callus formation, since the concentrations of endogenous auxin and cytokinins are not sufficient to perform this process (George, 2008). The use of 2.4-D and picloram was effective to induce friable embryogenic callus in the different tested explants, after 120 d of *in vitro* inoculation (Figure 1 B). In contrast, Miachir *et al.* (2004) found no induction of callus explant in any of *Curcuma zedoaria* when using only 2.4-D in the culture medium.

There was an increase in the percentage of callus (100 %) on the surface of the explant R1 rhizome as the concentrations of picloram or 2.4-D were raised to 2.5 mg (Figure 2 A). These results are different to those obtained by Lincy *et al.* (2009), who found that the use of 2.4-D at 1.0 and 2.0 mg L⁻¹ in rhizomes of *Zingiber officinale* Rosc. favored callus induction by 70 and 100 %.

A similar tendency was observed for R2 rhizomes, with an increase in callus formation (100 %) for 1.0 and 2.0 mg L⁻¹ 2.4-D and 4.0 mg L⁻¹ picloram, and there were significant differences between the treatments (Figure 2 B). This result is analogous to that obtained by Roopadarshini (2010) who, using *in vitro* vegetative buds of *Curcuma longa* L., reported 86 % callus with 3.0 mg L⁻¹ 2.4-D and 38 % with 0.5 mg L⁻¹ 2.4-D.

There were significant differences for callus formation in explants of rhizome R3. Thus, the best response (100 %) was for 4.0 mg L⁻¹ picloram

de acuerdo a Steiner *et al.* (2005). Las fotomicrografías se hicieron con una cámara digital EIREKAM 3.0 (2048×1536 píxeles efectivos, EE.UU.), acoplada a un microscopio óptico (Olympus BX 60).

La determinación de la cantidad de ADN y nivel de ploidía se realizó en tres repeticiones de 300 mg a partir del callo de cada tratamiento. Las muestras fueron trituradas en una caja petri que contenía 1 mL de amortiguador LB01 de extracción (Dolezel *et al.*, 1989). El peso de una hoja de guisante (*Pisum sativum*) se utilizó como cantidad estándar de referencia del ADN=9.9 pg. Los histogramas se obtuvieron en un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson, EE.UU.) con el software Cell Quest (Dickinson, 1998). La cantidad de ADN (pg) se calculó con la ecuación: Cantidad de ADN (pg) = (punto más alto de la muestra G1 / punto más alto del guisante G1) × 9.09. El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el software WinMDI 2.8 (Trotter, 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En ausencia de reguladores de crecimiento, no se formó callo en ninguno de los cinco explantes incluidos en este estudio, pero los rizomas formaron plantas completas y brotes laterales (Figura 1 D). La mayoría de las especies requieren reguladores de crecimiento para iniciar el proceso de formación de callos, pues las concentraciones de auxina endógena y citoquininas no son suficientes para llevar a cabo este proceso (George, 2008). El uso de 2.4-D y picloram fue efectivo para inducir el callo embriogénico friable en los diferentes explantes evaluados, después de 120 d de la inoculación *in vitro* (Figura 1 B). En contraste, Miachir *et al.* (2004) no observaron inducción de callo en explantes en ninguna de las plantas de *Curcuma zedoaria* al usar sólo el 2.4-D en el medio de cultivo.

Hubo un aumento en el porcentaje de callo (100 %) en la superficie del rizoma R1 del explante al aumentar las concentraciones de picloram o de 2.4-D a 2.5 mg (Figura 2 A). Estos resultados son diferentes a los obtenidos por Lincy *et al.* (2009), quienes encontraron que el uso de 2.4-D a 1.0 y 2.0 mg L⁻¹ en rizomas de *Zingiber officinale* Rosc. favoreció la inducción de callo en 70 y 100 %.

Una tendencia similar se observó en los rizomas R2, con un aumento en la formación de callos (100 %) con 1.0 y 2.0 mg L⁻¹ de 2.4-D y 4.0 mg L⁻¹ de picloram, y no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 2 B). Este resultado es semejante

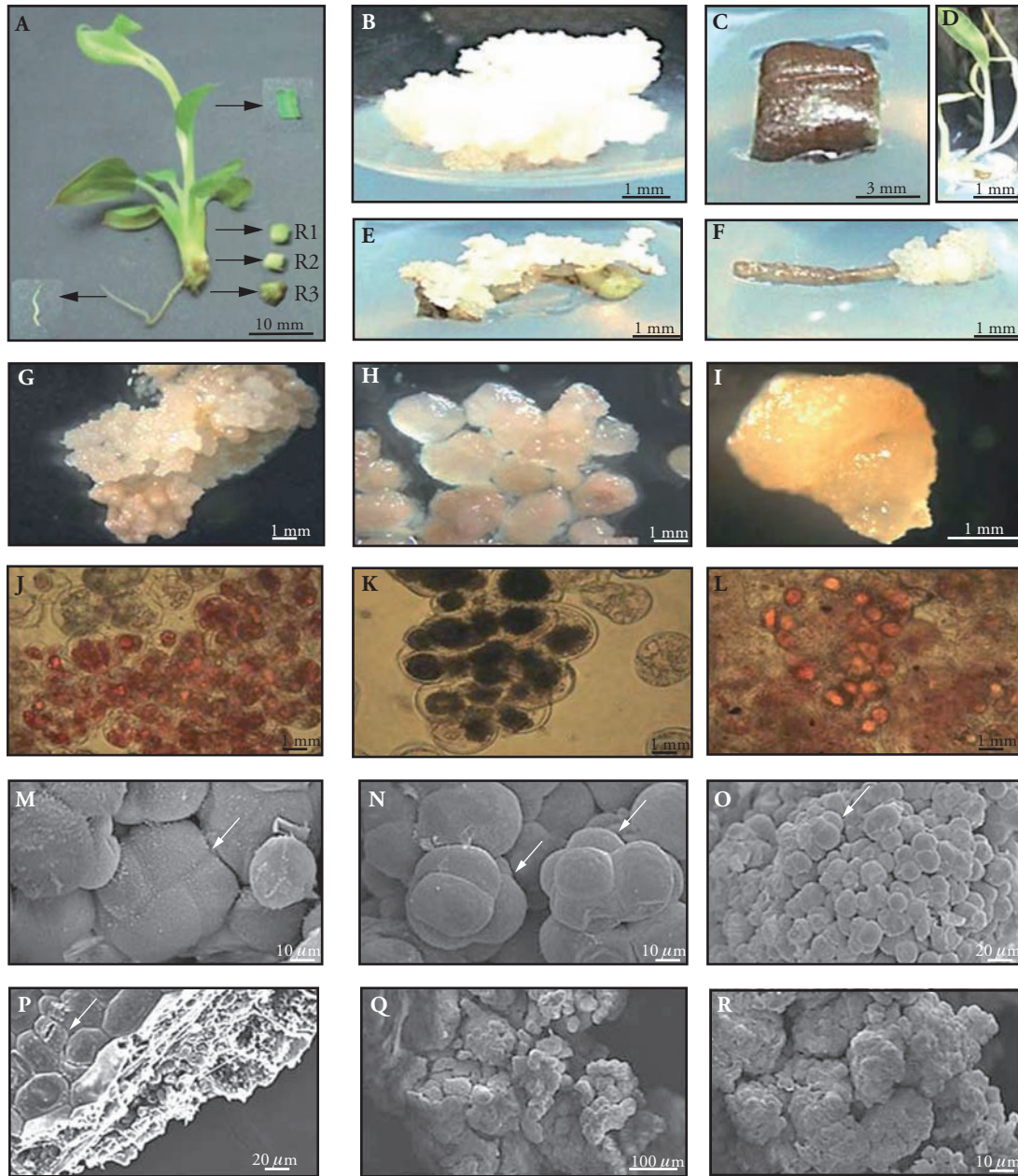


Figure 1. (A) *In vitro* torch ginger (*Etilingera elatior*) plant from which the explants were excised. (B) Rhizome with callus formation. (C) Segment start-leaf rust. (D) Etiolated shoots of rhizome without growth regulator. (E) Segment sheet of callus with 1.0 mg L^{-1} 2,4-D. (F) Root segment with callus formation with 1.0 mg L^{-1} 2,4-D. (G, H, I) Globular-shaped embryogenic callus. (J, L, M) Cytochemical analyses with acetic carmine and Evans blue, lugol and Sudan III in embryogenic callus from rhizome segments. (N, O, P) Globular-stage somatic embryos (arrows) from callus of rhizomes incubated with 1.0 mg L^{-1} 2,4-D. (Q and R) Callus segments formed leaves 1.0 mg L^{-1} 2,4-D. (S) Callus formed in root segments with 4.0 mg L^{-1} picloram.

Figura 1. (A) Planta de jengibre antorcha (*Etilingera elatior*) *in vitro* de la que se extirparon los explantes. (B) Rizoma con formación de callos. (C) Segmento de hoja en roya. (D) Brotes de rizoma decolorados sin regulador de crecimiento. (E) Segmento de hoja de callos con 1.0 mg L^{-1} de 2,4-D. (F) Segmento de raíz con formación de callos con 1.0 mg L^{-1} de 2,4-D. (G, H, I) Callo embriogénico con forma globular. (J, K, L) Análisis citoquímicos con carmín acético y azul de Evans, lugol y Sudán III en callo embriogénico a partir de segmentos de rizomas. (M, N, O) Embriones somáticos en etapa globular (flechas) a partir de callos de rizomas incubados con 1.0 mg L^{-1} 2,4-D. (P y Q) Segmentos de callos formados de hojas con 1.0 mg L^{-1} de 2,4-D. (R) Callo formado en segmentos de raíz con 4.0 mg L^{-1} de picloram.

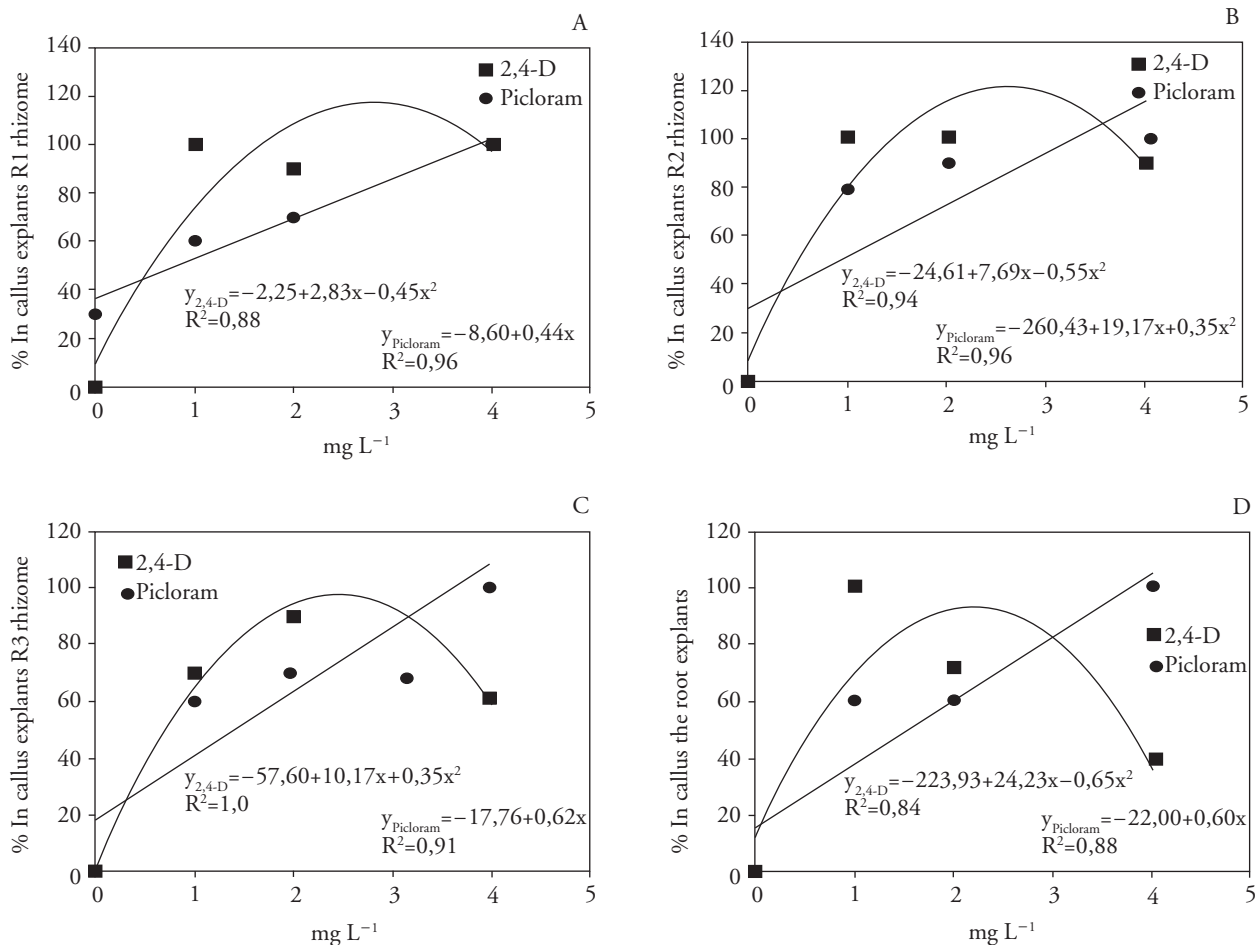


Figure 2. A) Percentage of callus formation in rhizome segments (R1). B) Percentage of callus formation in rhizome segments (R2). C) Percentage of callus formation in rhizome segments (R3). D) Percentage of training callus on root segments (r) of torch ginger grown on MS media with different concentrations of 2.4-D and picloram 120 d after inoculation *in vitro* and in the dark.

Figura 2. 1) Porcentaje de formación de callos en segmentos de rizomas (R1). 2) Porcentaje de formación de callos en segmentos de rizomas (R2). 3) Porcentaje de formación de callos en segmentos de rizomas (R3). 4) Porcentaje de formación de callos en segmentos de raíz (r) de jengibre antorcha cultivado en el medio MS con diferentes concentraciones de 2.4-D y picloram 120 d después de la inoculación *in vitro* y en la oscuridad.

(Figure 2 C), whereas with 2,4-D callus formation was similar for 1.0 and 2.0 mg L⁻¹ (90 %) but with 4.0 mg L⁻¹ it decreased to 60 %. Different results were obtained by Rostiana and Syahid (2008) who found a significant difference for meristems of *Zingiber officinale* Rosc. with 1.0 (87 %), 2.0 (47 %) and 3.0 mg L⁻¹ (28 %) of 2.4-D.

For root segments, there were also significant differences between treatments at the concentrations of 1.0 mg L⁻¹ 2.4-D and 4.0 mg L⁻¹ picloram (100 %) (Figure 2 D). This result is different to that reported by Miachir *et al.* (2004) who found no callus formation in root segments in *Curcuma zedoaria* when using 2.4-D.

al obtenido por Roopadarshini (2010), quien al utilizar brotes vegetativos *in vitro* de *Curcuma longa* L. reportó la formación de 86 % de callos con 3.0 mg L⁻¹ de 2.4-D y 38 % con 0.5 mg L⁻¹ de 2.4-D.

Diferencias significativas se encontraron en la formación de callos en los explantes del rizoma R3. Por lo tanto, la mejor respuesta (100 %) fue de 4.0 mg L⁻¹ picloram (Figura 2 C), mientras que con 2.4-D, la formación de callo fue similar con 1.0 y 2.0 mg L⁻¹ (90 %) pero con 4.0 mg L⁻¹ se redujo a 60 %. Sin embargo, Rostiana y Syahid (2008) encontraron una diferencia significativa en los meristemos de *Zingiber officinale* Rosc. con 1.0 (87 %), 2.0 (47 %) y 3.0 mg L⁻¹ (28 %) de 2.4-D.

The high percentages of embryogenic callus arising from root segments and sections of rhizome increase the availability of sources of torch ginger explants, since it was obtained in 60 to 100 % of embryogenic callus with the regulators utilized in the present study.

The increase in the concentrations of 2.4-D and picloram caused only a small increase in callus formation in leaf explants, but there was no significant difference between treatments and the maximum was 20 % with 4.0 mg L⁻¹ of both growth regulators. Different results were reported by Sultana *et al.* (2009) who found that leaf explants of *Zingiber officinale* Rosc. induced 67 % of embryogenic callus.

The effects 2.4-D and picloram were studied in somatic embryogenesis of *Cleome rosea* Vahl by Simões *et al.* (2010), who found that both regulators were effective in callus formation but only 2.4-D caused somatic embryogenesis. According to Jimenez (2005), 2.4-D is the most used auxin in the induction of callus and somatic embryos, combined with picloram, which may be more effective than 2.4-D (George, 2008). However, in the present study, picloram was more efficient for all segments used (except for leaves). The callus formed in the presence of both 2.4-D and picloram had a white-yellowish coloration without oxidation, a friable appearance, and formation of a structure similar to globular embryos (Figure 1G, H and I). These structures are characteristic of the first stage of tissue differentiation and are the first indication of success in a protocol that aims for somatic embryogenesis.

A more friable texture was found in callus grown at 1.0 and 2.0 mg L⁻¹ 2.4-D. Root-like structures were observed in callus masses that formed in roots segments on medium with 4.0 mg L⁻¹ 2.4-D, which were probably originated via somatic embryogenesis. This would agree with Reis *et al.* (2007), who showed roots originated from callus on *Schizolobium parahyba* grown at 6.0 mg L⁻¹ 2.4-D. These roots had no vascular communication with the explant.

In the analysis by SEM, it was observed that the cell masses developed under the influence of 2.4-D had a rounded shape in all explants tested (Figure 1 N, O, P, Q, R and S). It was possible to distinguish regions with a spherical organization presenting isodiametric cells with a similar shape to the globular stage of somatic embryos, which, according to Evert (2006), is characteristic of meristematic cells.

En los segmentos de raíz, también hubo diferencias importantes entre los tratamientos con las concentraciones de 1.0 mg L⁻¹ de 2.4-D y 4.0 mg L⁻¹ de picloram (100 %) (Figura 2 D). Este resultado es diferente al reportado por Miachir *et al.* (2004) quienes no encontraron formación de callos en los segmentos de raíz de *Curcuma zedoaria* al utilizar 2.4-D.

Los porcentajes altos de callo embriogénico derivados de segmentos de raíz y secciones de rizoma aumentaron la disponibilidad de fuentes de explantes de jengibre antorcha, ya que se obtuvieron en 60 a 100 % de los callos embriogénicos con los reguladores utilizados en el presente estudio.

El aumento de las concentraciones de 2.4-D y picloram produjo sólo un incremento pequeño en la formación de callo en los explantes de hoja, pero no hubo diferencias significativas entre los tratamientos y el máximo fue de 20 % con 4.0 mg L⁻¹ de los dos reguladores de crecimiento. Sultana *et al.* (2009) reportaron diferentes resultados, ya que encontraron que los explantes de hoja de *Zingiber officinale* Rosc. indujeron 67 % del callo embriogénico.

Los efectos de 2.4-D y picloram fueron estudiados en la embriogénesis somática de *Cleome rosea* Vahl por Simões *et al.* (2010), quienes encontraron que ambos reguladores fueron eficaces en la formación de callos, pero sólo el 2.4-D produjo embriogénesis somática. Según Jiménez (2005), 2.4-D es la auxina más utilizada en la inducción de callo y embriones somáticos que, combinada con picloram, puede ser aún más eficaz (George, 2008). Sin embargo, en el presente estudio, picloram fue más eficiente en todos los segmentos utilizados (con excepción de las hojas). El callo formado en presencia tanto de 2.4-D como de picloram tuvo una coloración blanca amarillenta sin oxidación, un aspecto friable y la formación de una estructura similar a embriones globulares (Figura 1G, H e I). Estas estructuras son características de la primera etapa de diferenciación de los tejidos y son la primera señal de éxito de un protocolo que tiene como objetivo generar embriogénesis somática.

Una textura más friable fue observada en el callo cultivado con 1.0 y 2.0 mg L⁻¹ de 2.4-D. Estructuras en forma de raíz se encontraron en masas de callo que se formaron en segmentos de raíces en un medio con 4.0 mg L⁻¹ de 2.4-D, que probablemente se originaron a través de embriogénesis somática. Esto coincidiría con Reis *et al.* (2007) que mostraron raíces que se originaron a partir de callos en *Schizolobium parahyba*,

Similar results were also found by Ulisses *et al.* (2010), who used 2.4-D to induce callus in *Heliconia chartaceae* and obtained round cells and in cell division. According to Zuo *et al.* (2002), 2.4-D has the function of inducing somatic embryogenesis. Nogueira *et al.* (2007) also found that it was possible, with SEM, to observe clear cellular changes in shape over time of exposure in leaf segments of *Byrsonima intermedia* with the use of 2.4-D. This indicates that the presence of auxin is a crucial factor in signaling cell dedifferentiation and subsequent resumption of meristematic characteristics and it also favors somatic embryogenesis.

The cell masses under the influence of picloram showed cells in clusters with rounded shape, demonstrating the morphogenic ability of both auxins and, according to Steiner *et al.* (2005), isodiametric cells with such a shape are characteristic of embryogenic formations. Besides, it was observed that callus formation in the treatments containing picloram presented cells surrounded by a thin layer, typical of cells at the beginning of callus formation (Figure 1 R and S). The analysis with SEM confirmed the presence of proembryos in the callus and morphogenetic capacity of rhizome segments of torch ginger var. Porcelain. All callus originated with the addition of 2.4-D (Figure 1 J) and picloram showed a positive reaction to acetocarmine stain, which confirmed the presence of pro-embryogenic cells. According to Besson *et al.* (2010), friable callus with granular texture exhibit small isodiametric cells, which react with acetocarmine and are indicative of the presence of glycoproteins associated with the embryogenesis route. Steiner *et al.* (2005) pointed out that the positive reaction to acetocarmine staining is associated with cell development competence. Besides, it was observed that there were two cell types in embryogenic cultures. For 2.4-D, the cells were less clustered (friable), for picloram, the cells had a certain clustering (compact).

The presence of starch was detected in embryogenic cells from both growth regulators. Starch grains were mainly found in the inner part of the proembryogenic tissue (Figure 1 L). Pescador *et al.* (2008) showed remarkable differences in nonstructural carbohydrates, with lower values of soluble sugars and a higher starch content in somatic embryos of *Acca sellowiana* when compared to zygotes. The possible role of starch in the somatic

cultivado con 6.0 mg L⁻¹ de 2.4-D. Estas raíces no tenían comunicación vascular con el explante.

En el análisis por medio de SEM se observó que las masas de células desarrolladas bajo la influencia de 2.4-D tenían una forma redondeada en todos los explantes analizados (Figura 1 M, N, O, P, Q y R). Fue posible distinguir regiones con una organización esférica de células isodiamétricas con una forma similar a la etapa globular de embriones somáticos que, según Evert (2006), es característica de las células meristemáticas. Resultados similares fueron reportados por Ulisses *et al.* (2010), que utilizaron 2.4-D para inducir callos en *Heliconia chartaceae* y obtuvieron células redondas y división celular. Según Zuo *et al.* (2002), 2.4-D tiene la función de inducir la embriogénesis somática. Nogueira *et al.* (2007) también encontraron que era posible con SEM observar los cambios celulares de la forma con el tiempo de exposición en los segmentos de hojas de *Byrsonima intermedia* después de aplicar 2.4-D. Esto indica que la presencia de la auxina es un factor crucial en señalar la desdiferenciación celular y la posterior reanudación de las características meristemáticas, y también favorece la embriogénesis somática.

Las masas de células bajo la influencia de picloram mostraron células en racimos con forma redondeada, lo que demuestra la capacidad morfogénica de las dos auxinas y, según Steiner *et al.* (2005), las células isodiamétricas con esta forma son características de formaciones embriogénicas. Además, se observó que las formaciones de callos en los tratamientos con Picloram presentaron células cubiertas por una capa delgada, típico de las células al inicio de la formación de callo (Figura 1 R y S). El análisis con SEM confirmó la presencia de proembriones en el callo y la capacidad morfogénica de segmentos de rizomas del jengibre antorcha var. Porcelana. Todos los callos que se originaron a partir de la adición de 2.4-D (Figura 1 J) y picloram revelaron una reacción positiva a la tinción con acetocarmín, lo cual confirmó la presencia de células pro-embriogénicas. Según Besson *et al.* (2010), el callo friable con textura granular presenta células isodiamétricas pequeñas, que reaccionan con el acetocarmín e indican la presencia de glucoproteínas relacionadas con la ruta de la embriogénesis. Steiner *et al.* (2005) señalaron que la reacción positiva a la tinción de acetocarmín está relacionada con la capacidad de desarrollar células. Además, se observó que había dos tipos de células en los cultivos

embryogenesis process is still unclear, but it is known that the reserve components found here are necessary for reorganization and cell differentiation. A positive reaction with Sudan III detected the presence of lipids, shown in a dark orange color (Figure 1 M), what highlights its importance as a reservesubstance. The starch synthesis can be directly associated with the mobilization of the lipid content via the glyoxylate cycle, since starch grains were detected in larger amounts than the lipid grains at the same development stage (Taiz, 2010).

The ploidy analysis by flow cytometry indicated that the amount of DNA of the individual plant and the *in vitro* plant showed no change, remaining at 5.42 ± 0.01 pg. The amount of DNA of callus, estimated with three samples, ranged from 5.43 to 10.15 pg (Table 1).

These results show evidence of the genetic stability of the callus in relation to the Mother plant in the field, which is important for plants requiring DNA and no genetic variability. Quantification of the amount of nuclear DNA may replace chromosome counting, which facilitates the work with a very large number of individuals (Schifino-Wittmann, 2001). The coefficient of variation (CV) from 0.3 to 2.26 (Table 1) indicated the uniformity of the population and reliability of the data. Marie and Brown (1993) and Ulrich and Ulrich (1991) showed that a CV between 1 and 2 % indicates high quality results, and approximately 3 % is routine, while Galbraith *et al.* (1983) define a CV below 5 % as an acceptance criterion for international publications.

The peaks of the mother plant and *in vitro* plant indicated that they were diploid plants (Figure 3) with scarce mitotic divisions in their tissue. Callus induced by 2.4-D showed 86 % stable and 14 %

embriogénicos. Con 2.4-D, las células estuvieron menos agrupadas en racimo (friable); para picloram, las células estaban un poco agrupadas en forma de racimo (compacto).

La presencia de almidón se detectó en células embriogénicas obtenidas con ambos reguladores del crecimiento. Los granos de almidón se encontraron principalmente en la parte interior del tejido pro embriogénico (Figura 1 K). Pescador *et al.* (2008) reportaron diferencias notables en hidratos de carbono no estructurales, con valores menores de azúcares solubles y un contenido mayor de almidón en los embriones somáticos de *Acca sellowiana* en comparación con los cigotos. La posible función del almidón en el proceso de embriogénesis somática no está claro todavía, pero se sabe que los componentes de reserva que se encontraron aquí son necesarios para la reorganización y la diferenciación celular. En una reacción positiva con Sudán III se detectó la presencia de lípidos, que se muestran en un color anaranjado oscuro (Figura 1 L), lo cual pone de relieve su importancia como sustancia de reserva. La síntesis de almidón puede estar directamente relacionada con la movilización del contenido de lípidos a través del ciclo del glioxilato, ya que se detectaron granos de almidón en cantidades mayores que las de los granos de lípidos en la misma etapa de desarrollo (Taiz, 2010).

El análisis de la ploidía por citometría de flujo indicó que la cantidad de ADN de la planta individual y de la planta *in vitro* no mostró algún cambio, permaneciendo en 5.42 ± 0.01 pg. La cantidad de ADN de callo, calculado con tres muestras, varió de 5.43 a 10.15 pg (Cuadro 1).

Estos resultados muestran evidencia de la estabilidad genética del callo en relación con la planta madre en el campo, lo cual es importante para las plantas que requieren ADN y no variabilidad genética. La cuantificación de la cantidad de ADN nuclear puede sustituir el conteo de cromosomas, facilitando el trabajo con una gran cantidad de individuos (Schifino-Wittmann, 2001). El coeficiente de variación (CV) de 0.3 a 2.26 (Cuadro 1) reveló la uniformidad de la población y la fiabilidad de los datos. Marie y Brown (1993) y Ulrich y Ulrich (1991) mostraron que un CV entre 1 y 2 % indica resultados de gran calidad y aproximadamente 3 % es de rutina; mientras que Galbraith *et al.* (1983) consideran un CV por debajo de 5 % como un criterio de aceptación para publicaciones internacionales.

Table 1. Estimates of the amount of DNA of plants and callus of torch ginger analyzed by flow cytometry.

Cuadro 1. Estimaciones de la cantidad de ADN de las plantas y callos de jengibre antorcha obtenidas con citometría de flujo.

	Quantity of DNA (pg)	CV
Field mother plant	5.42	0.30
<i>In vitro</i> plant	5.43	0.59
Stable callus	5.43	0.59
Mixoploids callus	1.34-10.15	0.39-2.26

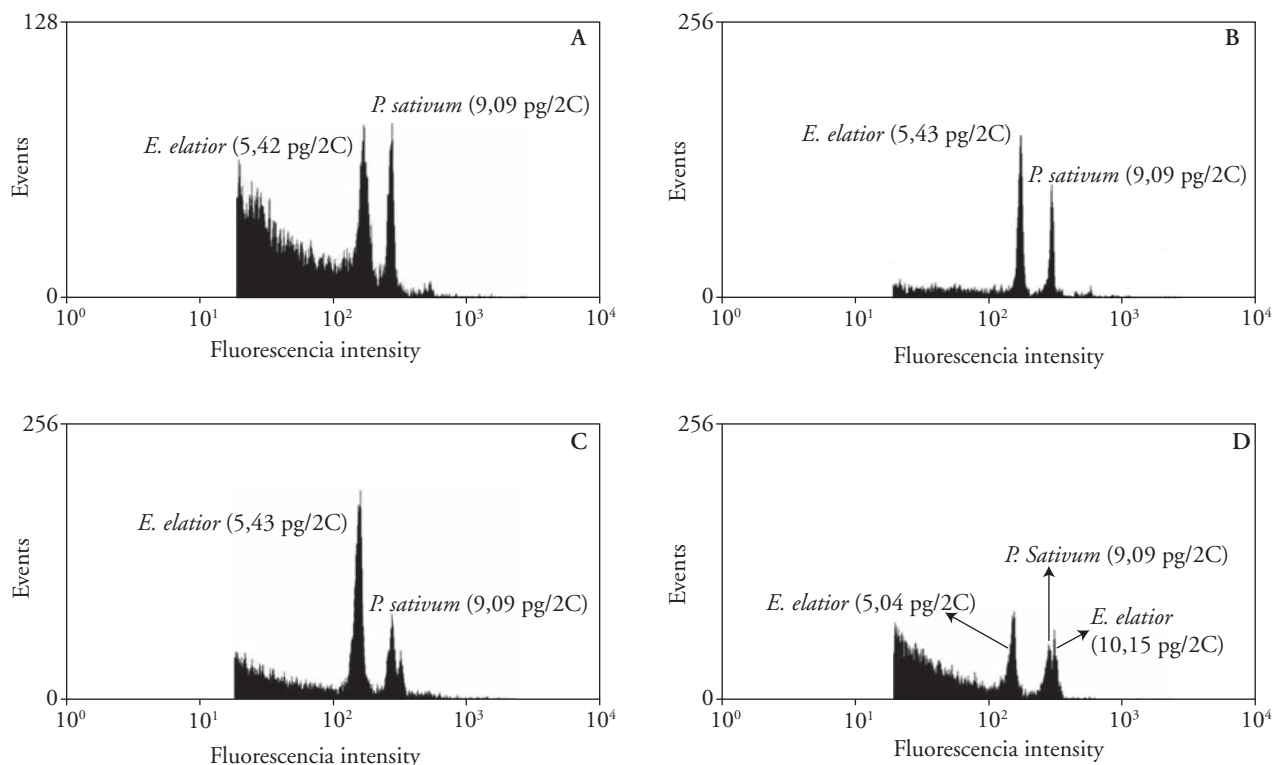


Figure 3. Histograms of flow cytometry in torch ginger (*Etilingera elatior*). A: Mother plant, B: *in vitro* plant, C: stable callus, and D: mixoploid callus.

Figura 3. Histogramas de citometría de flujo en jengibre antorcha (*Etilingera elatior*). A: planta madre, B: planta *in vitro*, C: callos estables y D: callos mixoploides.

mixoploids (Table 2), while those induced by picloram were 64 % stable and 36 % mixoploids. These results show greater variability in ploidy in callus induced by picloram. Lo Schiavo *et al.* (1989) indicated that the methylation degree increased as concentration of 2.4-D raised in the culture medium, whereas Muller *et al.* (1990) found that 2.4-D tends to accelerate cell division, which may indirectly affect genetic alteration and the methylation degree, which may interferes with DNA quantification.

The variations found in callus induced by 2.4-D and picloram may be related to the exposure time in the culture medium or to the high cell division or the explant. The mixoploidy found in the callus appeared from explants of the rhizome segments, which is consistent with the quote from Gutierrez and Ferrero (2005) that explants, as leaf tissue, roots and rhizomes, can accumulate a large number of somatic mutations.

The best results were obtained with the use of 2.4-D with rhizome explant of *in vitro* seedlings,

Los puntos más altos de la planta madre y la planta *in vitro* indicaron que eran plantas diploides (Figura 3), con divisiones mitóticas escasas en su tejido. Los callos inducidos por 2.4-D mostraron ser 86 % estables y 14 % mixoploides (Cuadro 2), mientras que los inducidos por picloram fueron 64 % estables y 36 % mixoploides. Lo anterior revela una variabilidad mayor en la ploidía en los callos inducidos por picloram. Lo Schiavo *et al.* (1989) indicaron que el grado de metilación aumentó en la medida en que se elevó la concentración de 2.4-D en el medio de

Table 2. Percentage of stable and mixoploids callus of *Etilingera elatior* incubated with 2,4-D and picloram. Cuadro 2. Porcentaje de callos estables y mixoploides de *Etilingera elatior* incubados con 2.4-D y picloram.

Classification	2,4-D	Picloram
Stable callus	86 %	64 %
Mixoploid callus	14 %	36 %

where more evidence of somatic embryos was exhibited. With the flow cytometric technique, it was possible to obtain the ploidy level of the embryogenic cells of torch ginger, and the regulator 2,4-D reached 84 % of stable callus. The callus induced by picloram showed greater mitotic activity (mixoploids) in the genetic material, compared to callus induced by 2,4-D.

CONCLUSIONS

The growth regulator 2,4-D induced callus genetically stable with high starch content and great potential for embryogenic callus induction, which inables the development of future methodologies.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for the granting of a scholarship and Embrapa Tropical Agroindustry Corporation for providing the seedlings for this work.

LITERATURE CITED

- Assis, S. M. P., R. R. L. Marinho, M. G. C. Goim Júnior, M. Menezes, e R. C. T. Rosa. 2002. Doenças e Pragas de Helicônias. Diseases and Pests of Helicônias. Recife UFRPE. 102 p.
- Besson, J. C. F., L. K. Oliveira, F. Cavalini, W. Neiverth, A. F. Neves, e S. Stefanello. 2010. Influência de reguladores de crescimento e extratos vegetais na resposta morfogênica de calos de *Solanum sessiliflorum* DUNAL. Rev. Agr. Meio Amb. 3(3): 311-322.
- Dickinson, B. 1998. CellQuest Software Reference Manual, rev. B. San Jose [s.n.] 227 p.
- Dolezel, J., P. Binarova and S. Lucretti. 1989. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. Biol. Plantarum 31(2): 113-120.
- Evert, R. F. 2006. Esau's Plant Anatomy, 3rd edn. Meristems, Cells and Tissues of the Plant Body – their Structure Function and Development. Wiley-Interscience, New Jersey.
- Ferreira, D. F. 2011. SISVAR: A Computer Statistical Analysis System. Ciência Agrotecnologia 35(6): 1039-1042.
- Galbraith, D. W., K. R. Harkins, J. M. Maddox, N. M. Ayres, D. P. Sharma, and E. Firoozabady. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell-cycle in intact plant-tissues. Science 220(4601): 1049-1051.
- Gutierrez, L. G. L., and V. M. Ferrero. 2005. Análise de ploidia por citometria de fluxo de calos embriogênicos de Aliso andino (*Alnus acuminata* H. B. K.). Sci. Tech. 11(28):157-161.
- George, E. F. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. 3. ed. Hants Exegetics. 1, 501 p.
- cultivo; por su parte, Muller *et al.* (1990) encontraron que el 2,4-D tiende a acelerar la división celular, lo que puede afectar indirectamente la alteración genética y el grado de metilación, que a su vez puede interferir en la cuantificación del ADN.
- Las variaciones encontradas en los callos que fueron inducidos por 2,4-D y picloram pueden estar relacionadas con el tiempo de exposición en el medio de cultivo o con la división celular elevada del explante. La mixoploidía que se encontró en el callo apareció en explantes de los segmentos de rizomas, lo cual coincide con lo reportado por Gutiérrez y Ferrero (2005) de que los explantes, como el tejido de hojas, raíces y rizomas, pueden acumular un gran número de mutaciones somáticas.
- Los mejores resultados se obtuvieron con el uso de 2,4-D en los explantes de rizomas de plántulas *in vitro*, donde hubo más evidencia de embriones somáticos. Con la técnica de citometría de flujo, fue posible obtener el nivel de ploidía de las células embriogénicas de jengibre antorcha, y el regulador 2,4-D alcanzó 84 % de callo estable. Los callos inducidos por picloram mostraron una actividad mitótica mayor (mixoploides) en el material genético, en comparación con los callos inducidos por 2,4-D.

CONCLUSIONES

El regulador de crecimiento 2,4-D indujo la formación de callo genéticamente estable con contenido alto de almidón y un gran potencial para la inducción de callo embriogénico, que permite el desarrollo de metodologías futuras.

—Fin de la versión en Español—

-----*-----

- Jiménez, V. M. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. Plant Growth Regul. 47(1/2): 91-110.
- Karnovsky, M. J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative in high osmolality for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 27: 137-138.
- Lincy, A. K., A. B. Remashree, and B. Sasikumar. 2009. Indirect and direct somatic embryogenesis from aerial stem explants of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). Acta Bot. Croatica 68(1): 93-103.
- Lins, S. R. O., e R. S. B. Coelho. 2004. Ocorrência de doenças em plantas ornamentais tropicais no Estado de Pernambuco. Fitopatol. Bras. 29: 332-335.

- Lo Schiavo, F., L. Pitto, G. Giuliano, G. Torti, V. Nuti-Ronchi, D. Marazziti, R. Vergara, S. Orselli, and M. Terzi. 1989. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variation as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theor. Appl. Genet.* 77: 325-331.
- Marie, D., and S. A. Brown. 1993. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biol. Cell* 78: 41-51.
- Miachir, J. I., V. L. M. Romani, A. F. de C. Amaral, M. O. Mello, O. J. Crocomo, and M. Melo. 2004. Micropropagation and callogenesis of *Curcuma zedoria* Roscoe. *Scientia Agricola* 61: 427-432.
- Muller, E., P. T. H. Brown, S. Hartke, and H. Lorz. 1990. DNA variation in tissue culture-derived rice plants. *Theor. Appl. Genet.* 80: 673-679.
- Murashige, T., and F. A. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 25: 473-497.
- Nogueira, R. C., R. P. Paiva, J. M. P. Porto, P. M. Nicioli, V. C. Stein, S. Deuner, and E. Alves. 2007. Análise ultraestrutural de calos embriogênicos de murici-pequeno (*Bysonima intermédia* a. Juuss.). *Rev. Bras. Biociên.* 5: 48-50.
- Pescador, R., G. B. Kerbauy, J. E. Kraus, W. de W. M. Ferreira, M. P. Guerra, and R. de C. L. F. Ribeiro. 2008. Changes in soluble carbohydrates and starch amounts during somatic and zygotic embryogenesis of *Acca sellowiana* (Myrtaceae). *Vitro Cellular Develop. Biology-Plant* 44: 289-299.
- Reis, I. N. R. de S., O. A. Lameira, e I. M. C. C. Cordeiro. 2007. Efeito do 2,4-D na indução de calos *in vitro* de paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barney). *Rev. Bras. Biociên.* 5: 498-500.
- Roopadarshini, V. 2010. High frequency shoot multiplication and callus regeneration of turmeric. *Int. J. Biotechnol. Biochem.* 6: 723-733.
- Rostiana, O., and S. F. Syahid. 2008. Somatic embryogenesis from meristem explants of ginger. *Biotropia* 15: 12-24.
- Santos, A. L. W., V. Silveira, N. Steiner, M. Vidor, and M. P. Guerra. 2002. Embriogênese somática em araucária (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 45: 97-106.
- Simões, C., N. Albarello, C. H. Callado, T. C. Castro, and E. Mansur, E. 2010. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of cleome rosea vahl. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 53: 679-686.
- Steiner, N., F. N. Vieira, S. Maldonado, and M. P. Guerra. 2005. Effect of carbon source on morphology and histodifferentiation of *Araucaria angustifolia* embryogenic cultures. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48: 895-903.
- Sultana, A., L. Hassan, S. D. Ahmad, A. H. Shah, F. Batool, M. A. Islam, R. Rahman, and S. Moonmoon. 2009. In vitro regeneration of ginger using leaf, shoot tip and root explants. *Pak. J. Bot.* 41: 1667-1675.
- Titon, M., A. Xavier, W. C. Otoni, e S. Y. Motoikes. 2007. Efeito dos reguladores de crescimento dicamba e picloram na indução de embriogênese somática em *Eucalyptus grandis*. *Revista Árvore* 31: 417-426.
- Trotter, J. 2000. WinMDI© Version 2.8. La Jolla, CA: The Scripps Research Institute. <http://facs.scripps.edu/software.html>
- Ulrich, I., and W. Ulrich. 1991. High-resolution flow cytometry DNA in higher plants. *Protoplasma* 165: 212-215.
- Ulisses, C., T. R. Camara, C. C. de A. Wiladino, and J. Z. Brito. 2010. Early somatic embryogenesis in *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy Pink ovary section explants. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53: 11-18.
- Yunus, M. F., M. A. Aziz, M. A. Kadir, and A. A. Rashid. 2012. *In vitro* propagation of *Etilingera elatior* (Jack) (torch ginger). *Scientia Horticulturae* 135: 145-150.
- Zuo, J., Q. W. G. Niu, and N. H. C. Frugis. 2002. The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *The Plant J.* 30: 349-359.