

Multiplicación *in vitro* de *Zingiber officinale* Roscoe cv. 'Gran Caimán' en Sistema de Inmersión Temporal

Juan G. Villegas Ramírez^{1*}, Tomás Palma Zúñiga¹

¹Centro de Investigación en Agroindustria, Biotecnología y Veterinaria (CIABIV), Escuela Técnica Agrícola e Industrial (ETAI). Santa Clara. San Carlos. Costa Rica. CP 21002.

*Autor para correspondencia e-mail: juan7villegas@gmail.com

RESUMEN

El jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) es una planta de gran interés por sus propiedades y usos. Aunque se ha propagado *in vitro* en medios de cultivo semisólidos, el empleo de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) podría ser una alternativa para incrementar el número de plantas. La investigación tuvo como objetivo multiplicar *Z. officinale* en SIT. Se ejecutaron cuatro experimentos con los que se seleccionaron el tiempo de inmersión (5, 10 y 15 minutos), la frecuencia de inmersión (cuatro inmersiones cada tres horas, dos inmersiones cada 12 horas y una inmersión cada 24 horas), el volumen de medio de cultivo por explante (30, 40 y 50 ml) y una comparación del sistema SIT, con el método convencional de propagación en medio de cultivo semisólido. Se comprobó que el tiempo de inmersión no influyó sobre las variables evaluadas. Con inmersiones cada seis horas (cuatro inmersiones al día) se obtuvo el mayor coeficiente de multiplicación, longitud de los brotes y número de raíces. Con 20 ml de medio de cultivo por explante las plantas se observaron cloróticas y no se encontraron diferencias significativas entre 40 y 60 ml. La utilización de SIT con un tiempo de inmersión de 5 minutos, una frecuencia de inmersión cada 6 horas y un volumen de medio de cultivo de 40 ml/explante, superó la respuesta obtenida de brotes de jengibre cultivados en medio de cultivo semisólido. El empleo de SIT para la multiplicación *in vitro* de *Zingiber officinale* Roscoe cv. 'Gran Caimán' incrementa el coeficiente de multiplicación y mejora las características de las plantas obtenidas. Se recomienda su uso como alternativa para propagar este cultivar seleccionado por productores del cantón de Guatuso, Alajuela, Costa Rica.

Palabras clave: coeficiente de multiplicación, jengibre, organogénesis

In vitro multiplication of ginger *Zingiber officinale* Roscoe, cv. 'Grand Caiman' in Temporary Immersion System

ABSTRACT

Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) is a plant of great interest for its properties and uses. Although it has been *in vitro* propagated in semi-solid culture media, the use of Temporary Immersion Systems (TIS) could be an alternative to increase the number of plants. The research aimed to multiply *Z. officinale* in TIS. Four experiments were carried out for selecting the immersion time (5, 10 and 15 minutes), the immersion frequency (four immersions every three hours, two every 12 hours and one every 24 hours), the volume of medium culture by explant (30, 40 and 50 ml) and a comparison of the TIS system, with the conventional method of propagation in semi-solid culture medium. It was found that the immersion time did not influence the evaluated variables. With immersions every six hours (four per day) the highest multiplication coefficient, shoot length and number of roots were obtained. With 20 ml of culture medium per explant, the plants were observed chlorotic and no significant differences were found between 40 and 60 ml. The use of TIS with an immersion time of 5 minutes, an immersion frequency every 6 hours and a volume of culture medium of 40 ml / explant, improved the response obtained from ginger shoots grown in semi-solid culture medium. The use of SIT for *in vitro* multiplication of *Zingiber officinale*

Roscoe cv. 'Grand Cayman' increases the multiplication coefficient and improves the characteristics of the plants obtained. Its use is recommended as an alternative to propagate this cultivar selected by producers from the canton of Guatuso, Alajuela, Costa Rica.

Keywords: jengibre, multiplication coefficient, organogenesis

INTRODUCCIÓN

El jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) es una planta rizomatosa, perenne y es ampliamente usada como especia en alimentos y bebidas. Se usa especialmente en la mayoría de los países asiáticos (Morales, 2007). En los últimos años ha crecido su producción debido al incremento de su uso en la medicina, como materia prima para la industria farmacéutica y en la vida cotidiana (Jyotsna *et al.*, 2017).

En medicina se ha estudiado como anticancerígeno y antimicrobiano. Se han identificado metabolitos secundarios de interés comercial tales como flavonoides y fenoles, así como el shogaol y el gingerol como los principales compuestos bioactivos (Garace *et al.*, 2017).

Los mercados internacionales han establecido como requisito, cultivos con un uso reducido de insumos químicos, con tecnologías limpias y amigables con el ambiente. Al respecto la producción masiva de jengibre por métodos de laboratorio garantiza un uso regulado de agroquímicos con la producción de plantas libres de enfermedades y plagas (Palma y Matarrita, 1992).

Los estudios que se han realizado en Costa Rica incorporando biotecnología al cultivo de jengibre son limitados. Sin embargo, se han hecho esfuerzos significativos en otros países donde también se siembra. La literatura científica disponible se concentra principalmente en la micropropagación vía organogénesis a partir de yemas de rizoma utilizados como explante inicial en medios de cultivo semisólidos.

La primera publicación sobre propagación *in vitro* de jengibre corresponde a Hosoki y Sagawa (1977). Posteriormente, De Lange *et al.* (1987) micropropagaron jengibre con el fin de eliminar los nematodos *Meloidogyne incognita* y *M. javanica* en el sur de África. Un año después, Bhagyalakshmi y Sing

(1988) utilizaron las técnicas *in vitro* para clonar una variedad de jengibre con altas concentraciones de oleorresinas.

Además, la propagación *in vitro* vía organogénesis en esta especie se ha informada por Noguchi y Yamakawa (1988), Ikeda y Tanabe (1989), Palma y Matarrita (1992), Khatun *et al.* (2003) y Kavyashree (2009). De igual forma, la propagación vía callo y embriogénesis somática se evidencia en las publicaciones de Babu *et al.* (1992) y Kackar *et al.* (1993). También Dekkers *et al.* (1991) utilizaron las técnicas *in vitro* para conservar germoplasma de jengibre así como Sharma y Sing (1997) para eliminar agentes causales de enfermedades.

La propagación *in vitro* de plantas puede realizarse tanto en medios de cultivo semisólidos como en medios de cultivo líquidos a través de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT). El SIT reduce los costos de producción y permite la semi-automatización del proceso. Además, facilita la toma de los nutrientes por los explantes ya que los medios de cultivo semisólidos hacen más lenta la difusión de los nutrientes a través del agar, las condiciones de cultivo son uniformes, permite obtener elevados coeficientes de multiplicación, se sustituyen fácilmente los medios de cultivo sin cambio de recipiente de cultivo y finalmente se reduce el tiempo de transferencia (Etienne y Berthouly, 2002). El medio de cultivo líquido en SIT permite la absorción rápida y eficiente de nutrientes por toda la superficie del tejido e influye en el desarrollo y estructura de estos (Preil, 2005).

En el cantón de Guatuso, Costa Rica, los productores han realizado selecciones de plantas de jengibre cv. 'Gran Caimán' durante más de 7 años. Sin embargo, no se dispone de una metodología para su propagación *in vitro* que les garantice contar con un elevado número de plantas con calidad genética y fitosanitaria para iniciar con éxito una plantación. Por otra parte, a pesar de las ventajas del empleo de los SIT para la

propagación *in vitro* de plantas, hasta el presente no se ha informado de su aplicación en el cultivo de jengibre. Considerando estos antecedentes, la investigación tuvo como objetivo multiplicar *Zingiber officinale* Roscoe. en SIT.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron yemas de rizomas de jengibre cv. 'Gran caimán' de las cuales se obtuvieron los brotes según protocolo propuesto por Palma y Matarrita (1992). Este mismo protocolo fue utilizado en SIT.

Para determinar la respuesta de jengibre a la multiplicación *in vitro* en SIT, se ejecutaron cuatro experimentos con los que se seleccionaron el tiempo de inmersión, la frecuencia de inmersión, el volumen de medio de cultivo por explante y una comparación del sistema SIT, con el método convencional de propagación en medio de cultivo semisólido.

Tiempo de inmersión

Se ensayaron tres tiempos de inmersión (5, 10 y 15 minutos) y se utilizó como constante el volumen de medio de cultivo (400 ml por unidad experimental, 40 ml por explante). En cada recipiente se colocaron 10 explantes. La frecuencia de inmersión fue de 12 horas y se consideró como constante para cada tiempo de inmersión.

Frecuencia de inmersión

Se evaluaron tres frecuencias de inmersión: cuatro inmersiones cada tres horas, dos inmersiones cada 12 horas y una inmersión cada 24 horas. Se utilizó el mejor tiempo de inmersión del experimento anterior y también como constante el volumen de 40 ml/explante con 10 explantes como unidad experimental lo que requirió un volumen total de 400 ml por frasco.

Volumen de medio de cultivo

En este ensayo se evaluaron tres volúmenes de medio 30, 40 y 50 ml por explante. Cada 10 explantes se conformó una unidad experimental, de tal modo que por cada

tratamiento se dispensaron 300, 400 y 500 ml por unidad SIT. El tiempo y la frecuencia de inmersión se seleccionaron de los ensayos anteriores.

Finalmente los mejores resultados en cuanto a coeficiente de multiplicación de brotes de jengibre como respuesta al tiempo de inmersión, la frecuencia de inmersión y el volumen de medio de cultivo en SIT, se compararon en un ensayo con la multiplicación de los explantes en medio de cultivo de cultivo semisólido (solidificado con agar).

En cada ensayo los explantes se mantuvieron en el medio de cultivo durante cuatro semanas.

Variables evaluadas

Las variables evaluadas en los SIT fueron las siguientes: longitud de brotes (cm), número de raíces (u) y coeficiente de multiplicación (u). Para la variable longitud se utilizó una regla graduada en mm. El coeficiente de multiplicación se determinó mediante las diferencias entre el número de brotes final y el número de brotes inicial. En el ensayo donde se compararon los resultados en SIT y medio de cultivo semisólido se evaluaron las variables anteriores y se adicionaron número de brotes/explante, No. hojas/ explante, longitud de la lámina foliar (cm), ancho lámina foliar (cm), número de raíces/explante, número de raíces/explante, longitud de raíces (cm) y relación parte aérea/raíz.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se realizaron cuatro experimentos, con un diseño completamente al azar, con cuatro repeticiones por tratamiento y 10 plántulas de jengibre por unidad experimental. Los tratamientos consistieron en el tiempo de inmersión, la frecuencia de inmersión y el volumen de medio de cultivo por SIT, cada tratamiento estuvo conformado por tres niveles del factor. Cada uno de los tratamientos se evaluó individualmente.

Para los cuatro experimentos, se realizó un análisis de varianza mediante el programa *Statistical Analysis System* (SAS) previa

comprobación de la normalidad de los datos y la homogeneidad de varianzas. De resultar significativo o altamente significativo, los promedios de resultado de cada tratamiento se ajustaron a un modelo de regresión con el fin de explorar y cuantificar la relación de dependencia entre las variables de respuesta o variables cuantitativas y las variables independientes en este caso el tiempo, frecuencia y volumen de medio de cultivo.

Una vez seleccionados los tratamientos de mejores resultados (tiempo de inmersión, frecuencia de inmersión y volumen de medio de cultivo) en los SIT, se compararon por medio de la prueba t de Student ($p < 0.05$), los resultados en SIT y en medio de cultivo semisólido.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza no mostró diferencias significativas para las variables consideradas en este estudio, como respuesta a los tres tiempos de inmersión evaluados durante cuatro semanas después de iniciado el estudio. A cada especie, cultivar y método de propagación se le debe ajustarse la duración del tiempo de inmersión, ya que una de las respuestas que deben evitar es la hiperhidricidad, lo cual se ha demostrado, limita el desarrollo de esquejes, por ejemplo, en la micropropagación de *Coffea arabica* L. y se

correlaciona con los tejidos y su prolongado tiempo de inmersión (Etienne y Berthouly, 2002). El análisis del tiempo de inmersión en otros cultivos tropicales como el banano cv. 'Grande naine' (*Musa AAA*) ha demostrado que presenta también influencia sobre los coeficientes de multiplicación (Colmenares y Giménez, 2003).

Los brotes que se formaron en este ensayo no mostraron síntomas de hiperhidricidad. No obstante, se consideró el menor tiempo de inmersión (5 minutos) como el recomendable para la micropropagación del jengibre mediante SIT para así prevenirla. Los tiempos de inmersión además de afectar el desarrollo del material vegetal por causa de un incremento en la hiperhidricidad provocan daños por el estrés oxidativo lo cual ha sido documentado previamente (Martre *et al.*, 2001).

Con un tiempo de inmersión de 5 min, 40 ml de medio de cultivo por explante y tres frecuencias de inmersión, la presencia de brotes fue evidente a partir de la segunda semana de cultivo. La mayoría de estos brotes no superaban 5 mm de longitud. A partir de la tercera semana, emergieron más brotes y raíces. Ya a las cuatro semanas de cultivo se encontraron diferencias significativas cuando se evaluaron la longitud de brotes, el número de raíces y el coeficiente de multiplicación (Tabla 1).

Tabla 1. Multiplicación de *Zingiber officinale* Roscoe. en SIT con tres frecuencias de inmersión.

Frecuencia de inmersión	Coficiente de multiplicación	Longitud de los brotes (cm)	No. raíces por brote
Cada 6 h	2.90	2.85	3.63
Cada 12 h	2.29	2.36	3.18
Cada 24 h	1.69	1.87	2.73
Ecuación de regresión	$Y=3.43-0.60x$	$Y=3.34-0.49x$	$Y=4.08-0.45x$
R ²	0.60	0.44	0.34
Fuente de variación			
Tratamiento	1.38*	1.21*	1.37*
Error	0.27	0.07	0.26
GL tratamiento	2.00	2.00	2.00
GL error	6.00	6.00	6.00
Coef. variación	21.88	10.76	15.59

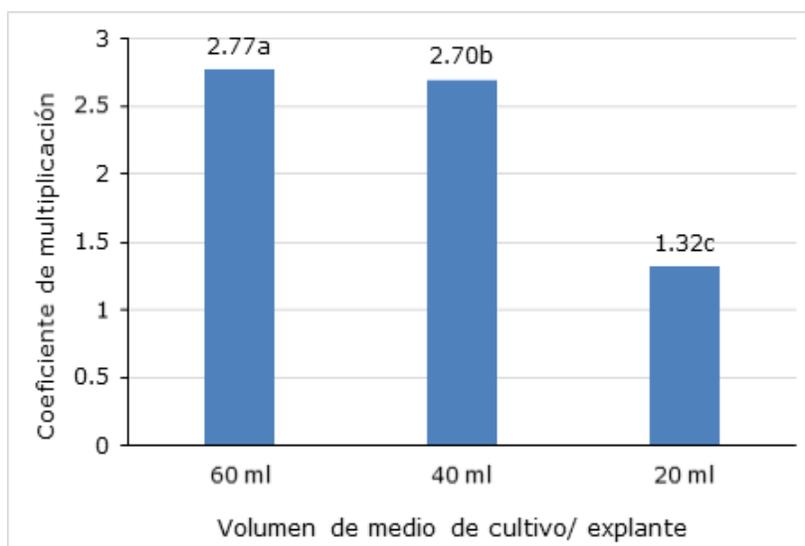
*diferencia significativa para $p < 0.05$. $n = 10$

Con inmersiones cada seis horas (cuatro inmersiones al día) se obtuvo el mayor coeficiente de multiplicación (2.9). Esta respuesta de formación de brotes en relación con la frecuencia de inmersión, se ajustó a una ecuación de regresión lineal decreciente ($R^2 = 0.60$). La importancia de considerar la frecuencia de inmersión, se acentúa si se toma en cuenta la fase de cultivo en la que deben satisfacerse oportunamente los requerimientos nutricionales del material vegetal (Escalona, 2006) o el tipo de cultivo. Tal es el caso del ñame (*Dioscorea alata* L.) donde las frecuencias de inmersión de cada 12 y 24 horas, mostraron menos posibilidades para asimilar nutrientes y acumular sustancias de reserva, comparadas con el tratamiento de cuatro inmersiones al día con el que los microtubérculos alcanzaron los mayores porcentajes de materia seca (Cabrera, 2009).

La frecuencia de inmersión del medio de cultivo tuvo influencia también sobre la longitud de los brotes y el número de raíces, de tal manera que los mayores valores se obtuvieron cuando la inmersión del medio de cultivo se realizó cada seis horas (Tabla 1). El medio de cultivo empleado (3 mg l^{-1} de Benciladenina y 1 mg l^{-1} de ácido naftalenacético) promovió el enraizamiento de las plantas *in vitro* de jengibre lo cual permitió contar simultáneamente con brotes y raíces. Estos

resultados coincidieron con los obtenidos por Palma y Matarrita (1992) cuando utilizaron el mismo medio de cultivo pero solidificado con agar. En relación con la formación de raíces y brotes se demostró por Aragón *et al.* (2006) el efecto que tiene la adición de auxina exógena en medios de cultivos en SIT que aumentó el vigor de los explantes en plátano (*Musa spp.*, CEMSA 3/4) y esta respuesta permitió el manejo posterior de las plántulas obtenidas, ya sea para el subcultivo y producción de brotes de buena calidad, o para la aclimatización de ese material vegetal. A partir de los resultados se seleccionó la frecuencia de inmersión cada 6 h.

De igual forma, el volumen de medio de cultivo (con tiempo de inmersión de 5 min y frecuencia de inmersión cada 6 h) influyó significativamente sobre el coeficiente de multiplicación. A la cuarta semana de cultivo se encontraron diferencias significativas entre tratamientos con el mayor valor para 60 ml (Figura 1). En relación con lo anterior, Berthouly y Etienne (2005) han demostrado que al evaluar un sistema de inmersión temporal, uno de los factores más importantes es el volumen de medio de cultivo utilizado y así lograr un sistema eficiente, lo cual se evidencia en los resultados del presente trabajo para la multiplicación *in vitro* de jengibre.



Letras sobre barras indican diferencias significativas según la prueba de Duncan ($p \leq 0.05$)

Figura 1. Coeficiente de multiplicación de plantas *in vitro* de *Zingiber officinale* en un biorreactor de inmersión temporal después de cuatro semana de cultivo con diferentes volúmenes de medio de cultivo por explante.

En el tratamiento con 20 ml de medio de cultivo por explante, se observaron plántulas cloróticas, situación que no se manifestó en los tratamientos de 40 y 60 ml por explante. Atendiendo a los resultados se seleccionó como mejor tratamiento a 40 ml/explante de medio de cultivo. Es necesario proveer a las plantas con suficientes cantidades de nutrientes esenciales, de tal manera que no sean un factor limitante para el desarrollo. Al evaluar el volumen de medio de cultivo, se comprende que existe relación entre la cantidad de explantes que se utilizan por unidad experimental con respecto al volumen de medio de cultivo y el tiempo de subcultivo (Berthouly y Etienne, 2005).

La comparación entre la multiplicación *in vitro* de *Z. officinale* en medio de cultivo semisólido y SIT (5 min de inmersión, cada seis horas y 40 ml de medio de cultivo por explante) demostró que este último propició mejor crecimiento y desarrollo de las plantas. En ambos sistemas de propagación se obtuvieron brotes y raíces. Las plantas

mostraron características fenotípicas similares (Figura 2).

La prueba de contraste de medias (t de Student) evidenció diferencias significativas cuando se comparó el número de brotes por explante en todo el periodo de cultivo (Figura 3).

El número de brotes a las cuatro semanas de cultivo se duplicó cuando los explantes crecieron en el medio de cultivo líquido del SIT (4.40). Estos resultados están en correspondencia con el hecho de que la biomasa se distribuyó eficientemente en la mayor cantidad de brotes con respecto al medio de cultivo semisólido. El medio de cultivo líquido con inmersión temporal facilita que los explantes asimilen rápidamente los nutrientes, lo que genera una mayor respuesta en un corto tiempo (Berthouly y Etienne, 2005). De esta manera en la primera semana de cultivo en SIT los explantes habían alcanzado un número de brotes aproximadamente igual que con cuatro semanas en medio de cultivo semisólido (Figura 2).

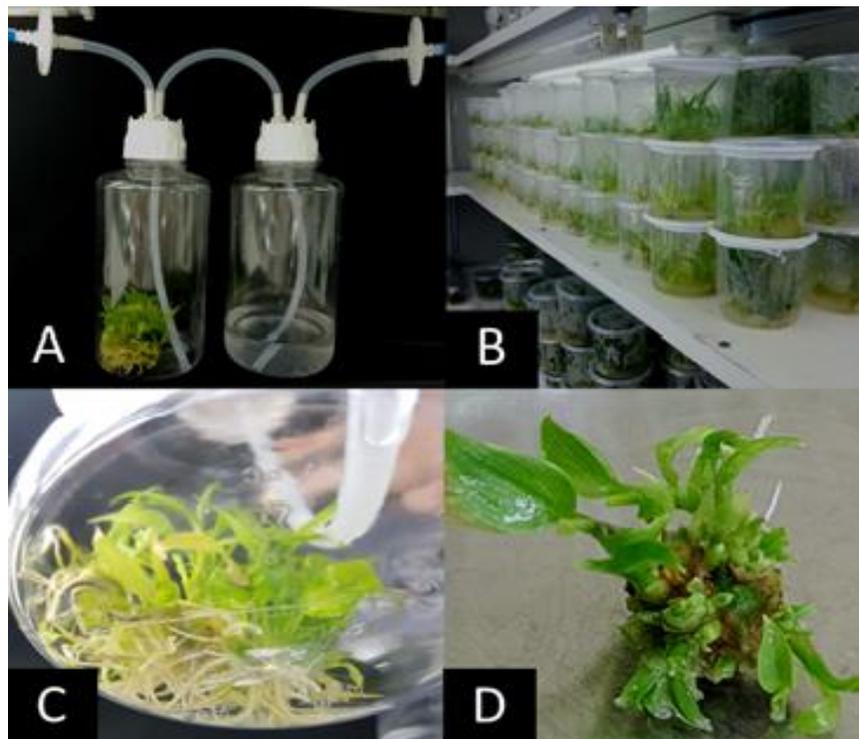
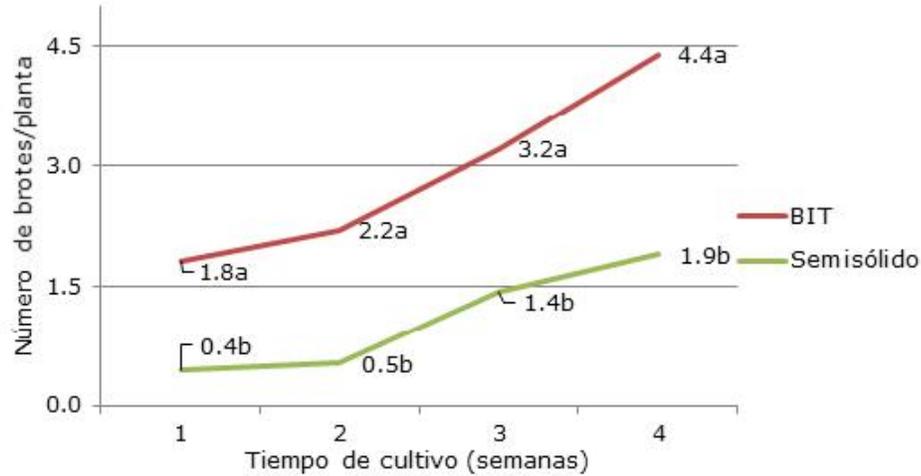


Figura 2. Multiplicación de *Zingiber officinale* Roscoe cv. 'Gran Caimán' en SIT. A, Unidad SIT usado en este estudio. B, Plántulas *in vitro* en medio de cultivo semisólido. C, Plántulas de jengibre con formación de raíces. D, Brotes obtenidos en SIT a las 4 semanas de cultivo.



Valores con letras diferentes para tiempo de cultivo indican diferencias significativas según la prueba *t* de Student para $p \leq 0.05$

Figura 3. Número de brotes de *Zingiber officinale* Roscoe cv. 'Gran Caimán' cuantificados en un medio de cultivo líquido en SIT y en un medio de cultivo semisólido.

Contrario a lo expuesto, los medios de cultivo semisólidos limitan la absorción que se realiza a través de difusión en el medio de cultivo. El paso a través de una matriz en un medio de cultivo solidificado dificulta la rapidez y como consecuencia el crecimiento es menor cuando se compara con los medios de cultivo líquidos (Lorenzo *et al.*, 1998). Los resultados demostraron que el uso de SIT incrementó la eficiencia en la propagación *in vitro* de jengibre con respecto al método convencional informado por Palma y Matarrita (1992).

Además del número de brotes por explante, a las cuatro semanas de cultivo las variables longitud de raíces y relación parte aérea/raíz fueron superiores cuando los explantes crecieron en los sistemas de inmersión temporal (Tabla 2). Resultados similares obtuvieron Albany *et al.* (2015) cuando compararon el medio de cultivo líquido con el medio de cultivo semisólido en las diferentes fases de la micropropagación de sábila (*Aloe barbadensis* Mill).

Un aspecto que se destacó en el estudio fue que el uso de los SIT permitió una mayor concentración de biomasa en la parte aérea y superó tres veces el obtenido en el medio de cultivo semisólido. Estos resultados son favorables para los medios de cultivo líquidos

por cuanto lo que se busca en estas etapas, mayor concentración de brotes, que se respalda por una mayor concentración de biomasa obtenida en los SIT.

En relación con la variable longitud de raíces, se observó una mejor respuesta cuando las plántulas de jengibre crecieron en un medio de cultivo semisólido, con un valor de 4.02 cm de longitud, comparado con los brotes que crecieron en los sistemas de inmersión temporal (Tabla 2). Esta condición de biomasa radical no es conveniente por cuanto lo que se busca es aumentar el coeficiente de multiplicación de brotes. Siguiendo lo establecido por Skoog y Miller (1957) quienes determinaron que el balance auxina/citocinina en el medio de cultivo puede controlar la morfogénesis *in vitro*, la formación de raíces en un brote se ve favorecida cuando la disponibilidad de nutrientes por difusión es lenta tal y como se observó en el presente estudio, cuando los brotes crecieron en medios de cultivo semisólidos. En esta condición se limita la absorción de los nutrientes, ya que estos pasan a formar parte de la matriz del gel y los explantes requieren mayor tiempo para manifestar crecimiento y los obliga a formar mayor cantidad de raíces (Lorenzo *et al.*, 1998).

Tabla 2. Indicadores de crecimiento de *Zingiber officinale* Roscoe cv. 'Gran Caimán' en un medio de cultivo líquido en SIT y en un medio de cultivo semisólido.

Variable	SIT	Medio de cultivo semisólido	Valor de p
Número de brotes/explante	4.40	1.90	0.0012*
Longitud del brote (cm)	2.02	1.82	0.4241
No. hojas/ explante	2.00	2.00	0.3559
Longitud de la lámina foliar (cm)	0.81	1.40	0.1071
Ancho lámina foliar (cm)	0.50	0.66	0.0500
Número de raíces/explante	2.60	3.27	0.2264
Longitud de raíces (cm)	1.75	4.02	0.0004*
Relación parte aérea/raíz	9.14	3.46	0.0002*
Incremento en masa fresca (g)	0.56	0.88	0.0859

*diferencia significativa según la prueba t de Student

De forma general, los experimentos desarrollados permitieron establecer una metodología que incrementa de forma significativa el coeficiente de multiplicación en jengibre, basada en el empleo de sistemas de inmersión temporal.

En este estudio se comprobó que el tipo de explante usado (yema del rizoma) fue apropiado y la combinación de 3 mg l⁻¹ de BA y 1 mg l⁻¹ de ANA en el medio de cultivo propuesto por Palma y Matarrita (1992) permitió la propagación *in vitro* del cultivar 'Gran Caimán' que fue seleccionado por productores del cantón de Guatuso, Alajuela, Costa Rica durante 7 años. La utilización de SIT con un tiempo de inmersión de 5 minutos, una frecuencia de inmersión cada 6 horas y un volumen de medio de cultivo de 40 ml/explante, superó la respuesta obtenida de brotes de jengibre cultivados en medio de cultivo semisólido.

CONCLUSIONES

El empleo de SIT para la multiplicación *in vitro* de *Zingiber officinale* Roscoe cv. 'Gran Caimán' incrementa el coeficiente de multiplicación y mejora las características de las plantas obtenidas. Se recomienda su uso como alternativa para propagar este cultivar seleccionado por productores del cantón de Guatuso, Alajuela, Costa Rica.

AGRADECIMIENTOS

A la Escuela Técnica Agrícola e Industrial (ETAI) a través del Centro de Investigación

en Agroindustria, Biotecnología y Veterinaria (CIABIV), y por supuesto a los Productores del Cantón de Guatuso por el apoyo que hizo posible este estudio.

Conflicto de interés

Los autores no declaran conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Albany NR, Vilchez S, León A, Nava LJ, Martínez MA, Molina (2015) Medios de cultivo líquidos: un avance para la micropropagación comercial de zábila (*Aloe barbadensis* Mill). Revista Colombiana Biotecnología 17(1): 24-31
- Aragón C, Escalona M, Capote I, Cejas I, Rodríguez R, Sandoval J, Roels S, Debergh P, González-Olmedo J (2006) Aspectos metabólicos del crecimiento y desarrollo de plántulas de plátano (CEMSA ¾) micropropagados en Biorreactores de Inmersión Temporal BIT. Cultivos Tropicales 27(1): 39-44
- Babu KN, Samasudeen K, Ratnambal MJ (1992) *In vitro* plant regeneration from leaf derived callus in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 29: 71-74
- Berthouly M, Etienne H (2005) Temporary immersion systems: a new concept for use liquid medium in mass propagation. En: Hvoslef-Eide AK, Preil W (Ed). Liquid Culture Systems or *in vitro* Plant Propagation, pp.

- 165-195. Springer Netherlands, Dordrecht; doi: 10.1007/1-4020-3200-5
- Bhagyalakshmi A, Singh NS (1988) Meristem culture and micropropagation of a variety of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) with a high yield of Oleoresin. J Hort Sci 63: 321-327
- Cabrera M (2009) Formación de microtubérculos de ñame (*Dioscorea alata* L.) clon Pacala duclos en sistema de inmersión temporal como material vegetal de plantación. Tesis para aspirar al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Santa Clara, Cuba
- Colmenares M, Giménez C (2003) Multiplicación *in vitro* de *Musa* spp. mediante sistema de inmersión temporal. Revista de la Facultad de Agronomía 20(4): 468-477
- De Lange JH, Willers P, Nel M (1987) Elimination of nematodes from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) by tissue culture. J Hort Sci 62: 249-252
- Dekkers AJ, Rao AN, Goh CJ (1991) *In vitro* storage of multiple shoot cultures of ginger at ambient temperature of 24-29°C. Sci Hortic 47: 157-168
- Escalona M (2006) Temporary immersion beats traditional techniques on all fronts. Prophyta annual 50: 48-50
- Etienne H, Berthouly M (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69 (3): 215-231
- Garace S, San k, Gopi M (2017) Antimicrobial Activity of Ethanolic Extract of *Zingiber officinales*- An *in vitro* Study. J Pharm Sci & Res 9(9): 1417-1419
- Hosoki T, Sagawa Y (1977) Clonal propagation of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe.) through tissue culture. HortScience 12: 451-452
- Ikeda LR, Tanabe MJ (1989) *In vitro* subculture applications of ginger. Hortic Sci 24: 142-143
- Jyotsna D, Neelam A, Viveka N (2017) A Review on *Zingiber officinale*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 6 (3): 174-184
- Kackar A, Bhat SR, Chandel KPS, Malik SK (1993) Plant regeneration via somatic embryogenesis in ginger. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 32: 289-292
- Kavyashree R (2009) An efficient *in vitro* protocol for clonal multiplication of ginger- var. Varada. Indian J Biotech 8: 328-33
- Khatun A, Nasrin S, Hossain MT (2003) Large scale multiplication of ginger (*Zingiber Officinale* Rosc.) from shoot-tip culture. J Biological Sci 3: 59-64
- Lorenzo JC, González B, Escalona M, Teisson CI, Espinoza C, Borroto C (1998) Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 54: 197-200; doi: 10.1023/A:1006168700556
- Martre P, Lacan D, Just D, Teison C (2001) Physiological effects of temporary immersion on *Hevea brasiliensis* callus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 67: 25-35; doi: 10.1023/A:1011666531233
- Morales AM (2007) El Cultivo del Jengibre, *Zingiber officinale*. Ministerio de Agricultura y Ganadería, San José
- Noguchi Y, Yamakawa O (1988) Rapid clonal propagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). Japan J Breed 38: 437-442
- Palma T, Matarrita G (1992) Propagación clonal de jengibre (*Zingiber officinale*) *in vitro*. Tecnología en Marcha 11 (3): 43-50
- Preil W (2005) General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. En: Hvoslef-Eide AK, Preil W (Ed). Liquid Culture Systems or *in vitro* Plant Propagation, pp.1-18. Springer Netherlands, Dordrecht; doi: 10.1007/1-4020-3200-5
- Sharma TR, Singh BM (1997) High-frequency *in vitro* multiplication of disease-free *Zingiber officinale* Rosc. Plant Cell Rep 17: 68-72
- Skoog F, Miller CO (1957) Chemical Regulation of Growth and Organ Formation in Plant Tissue

Cultured *in vitro*. Symposia of the Society for Experimental Biology 11: 118-131

Recibido: 22-10-2018

Aceptado: 24-05-2019

Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo una Licencia Creative

Commons Atribución-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>
Está permitido su uso, distribución o reproducción citando la fuente original y autores.