

UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA Y EL MAR
ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS

**Efecto del tiempo, frecuencia y volumen del medio en la
micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, Roscoe) variedad
gran caimán, en un biorreactor de inmersión temporal, Santa Clara,
San Carlos.**

Tesis de grado para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería Agronómica

Estudiante

Bach. Juan Gabriel Villegas Ramírez

Tutor

M.Sc. Ing. Tomás Palma Zúñiga

Asesores

M.Sc. Ing. Allan González Herrera

M.Sc. Ing. Amelia Paniagua Vásquez

Campus Omar Dengo
Heredia, Costa Rica, 2018

Efecto del tiempo, frecuencia y volumen de medio de cultivo en la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, Roscoe) variedad gran caimán, en un biorreactor de inmersión temporal, Santa Clara, San Carlos.

Estudiante

Bach. Juan Gabriel Villegas Ramírez

Trabajo final de graduación de tesis sometida a consideración del Tribunal examinador de la Escuela de Ciencias Agrarias, para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Agronómica.

**Trabajo final de gradación presentado como requisito parcial para optar al grado de
Licenciado en Ingeniería Agronómica.**

Tribunal Examinador

Dr. Rafael Evelio Granados Carvajal
Representante Decano FCTM

Ing. Juan Pablo Herrera Vargas
Representante Director Escuela de Ciencias Agrarias

M.Sc. Ing. Tomás Palma Zúñiga
Director de Tesis

M.Sc. Allan González Herrera
Asesor

M.Sc. Amelia Paniagua Vásquez
Asesor

Bach. Juan Gabriel Villegas Ramírez
Estudiante

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo principalmente a Dios y luego a mi familia, ya que ellos son el motor que me impulsa a seguir creciendo en todos los ámbitos y poder así aportar un granito de arena en este corto transitar de vida terrenal, ya que la espiritual es vida eterna.

AGRADECIMIENTO

Agradezco profundamente a mi estimado amigo don Tomás Palma Zúñiga, quien ha compartido su valioso tiempo y me ha ayudado para ser un mejor profesional y ser humano. Por su paciencia y siempre disponibilidad para la elaboración y revisión de este documento.

También quiero agradecer a la Ing Amelia Paniagua, quien estuvo presente en este proceso y a la cual estimo enormemente, por su colaboración y valiosos aportes en la revisión del presente documento.

Al Ing Juan Luis Ortiz, amigo de gran experiencia en biotecnología a nivel nacional, quien nunca dudo en compartir sus consejos para el éxito de este proyecto.

Al profesor Ing Allan González. Por su apoyo como miembro asesor del comité, sus valiosos consejos y su tiempo.

Al equipo de trabajo del laboratorio de biotecnología, Mónica Palma y Jasón Castro, personas fundamentales en la logística del uso y trabajo en laboratorio.

A la Escuela Técnica Agrícola e Industrial (ETAI) lugar donde trabajo e institución que considero mi familia, compañeros quienes siempre me apoyaron a seguir avanzando.

RESUMEN

Villegas R, J. 2018. Efecto del tiempo, frecuencia y volumen del medio en la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, Roscoe) variedad gran caimán, en un biorreactor de inmersión temporal, Santa Clara, San Carlos. Tesis Licenciatura Ciencias Agropecuarias. Santa Clara, San Carlos. pp

Palabras claves: *Zingiber officinale* Roscoe. Micropropagación, organogénesis, brotes adventicios, biorreactores de inmersión temporal, tiempo, frecuencia, volumen.

La presente investigación se realizó en el Centro de Investigación de Agroindustria Biotecnología y Veterinaria (CIABIV) de la Escuela Técnica Agrícola e Industrial (ETAI) con el fin de establecer la metodología necesaria para incrementar el coeficiente de multiplicación del jengibre (*Zingiber officinale*, Roscoe), variedad “gran caimán” mediante Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT).

Para los efectos se consideraron distintas etapas de la investigación, iniciando con la introducción del material proporcionado por productores de la zona del Coroso de Guatuso en Alajuela, quienes realizaron una selección natural de jengibre por aproximadamente 12 años.

El estudio con BIT consistió en realizar inicialmente, tres ensayos con tres tratamientos, y evaluar el tiempo de inmersión, considerando tres tratamientos: 5 min/día, 10 min/día, 15 min/día, luego se estudió la frecuencia de Inmersión cada 6, 12 y 24 horas y finalmente se determinó el volumen de medio de cultivo considerando como tratamiento los siguientes: 20 mL de medio/explante, 40 mL de medio/explante y 60 mL de medio/explante. Se contó con un total de 12 BIT, donde cada uno contenía 10 explantes de jengibre. Se utilizó un medio de cultivo Murashige Skoog (MS) suplementado con 1 mg/L de ANA y 3 mg/L de BA. Las condiciones del cuarto de crecimiento fueron: fotoperiodo de 16 horas, temperatura de 27 C° +/- 3 y una humedad relativa de 70 %.

El mejor tiempo de inmersión fue de 5 minutos, la mejor frecuencia de inmersión se estableció cada 6 horas y el mejor volumen fue de 40 mL/explante, dichas condiciones permitieron obtener el mayor coeficiente de multiplicación. El protocolo anterior obtenido

en los BIT se comparó con el método convencional, en un medio semi-sólido, mediante una prueba T student. Estos resultados permitieron establecer una metodología eficiente para la micropropagación de la variedad gran caimán de jengibre, utilizando un biorreactor de inmersión temporal, que superaron los coeficientes de multiplicación cuando se comparó con un medio convencional solidificado.

ABSTRACT

The present investigation was carried out in the Biotechnology and Veterinary Agroindustry Research Center (CIABIV) of the Agricultural and Industrial Technical School (ETAI) in order to establish the necessary methodology to increase the multiplication coefficient of ginger (*Zingiber officinale*, Roscoe), "Gran Caiman" variety through Temporary Immersion Bioreactors (BIT).

For the effects, different stages of the investigation were considered, beginning with the introduction of material provided by producers from the area of Coroso de Guatuso in Alajuela, who made a natural selection of ginger for approximately 12 years. It was considered the cleanliness of the rhizome and the introduction of the *in vitro* explant followed by the multiplication phases, the acclimatization of the plants and the satisfactory delivery of the clean material to the producers of the area.

The study with BIT consisted of initially carrying out three trials with three treatments, and evaluating the immersion time, considering: 5 min/day, 10 min/day, 15 min/day, then the immersion frequency was studied every 6, 12 and 24 hours and finally the volume of medium was determined: 20 mL of medium/explant, 40 mL of medium/explant and 60 mL of medium/explant. There was a total of 12 BIT where each contained 10 ginger explants. A Murashige Skoog (MS) culture medium supplemented with 1 mg/L of ANA and 3 mg/L of BA was used. The conditions of the growth room were: photoperiod of 16 hours, temperature of 27 C ° +/- 3 and a relative humidity of 70%.

The best immersion time was 5 minutes, the best immersion frequency was established every 6 hours and the best volume was 40 mL/explant, these conditions allowed obtaining the highest multiplication coefficient. The previous protocol obtained in the BITs was compared with the conventional method in a semi-solid medium by means of a Student's T-test and the liquid medium surpassed the semi-solid medium when the multiplication coefficient was quantified. These results allowed to establish an efficient methodology for the micropropagation of the "Gran caimán" variety using a temporary immersion bioreactor.

ÍNDICE

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vii
ÍNDICE.....	viii
LISTA DE CUADROS.....	x
LISTA DE CUADROS DE ANEXOS	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. GENERAL.....	18
2.2. ESPECÍFICOS	18
3. REVISIÓN DE LITERATURA	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
4.1. Ubicación del proyecto	24
4.2. Material experimental.....	24
4.3. Selección del rizoma y preparación de los explantes para la siembra <i>in vitro</i>	25
4.4. Fase I. Establecimiento aséptico.	25
4.4.1. Medio de cultivo.....	25
4.4.2. Medio de cultivo para BIT	26
4.5. Fase II. Estímulo de brotes preformados y adventicios	26
4.6. Tratamientos para evaluar la respuesta del jengibre en un Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT).....	26
4.6.1. Tiempo de inmersión	26
4.6.2. Frecuencia de inmersión	27
4.6.3. Volumen del medio de cultivo	27
4.6.4. Evaluación de medios de cultivo en BIT vs medios solidificados	27
4.7. Condiciones físicas del cuarto de crecimiento	27
4.8. Sistema de inmersión temporal para micro propagación de jengibre	28

4.9.	Diseño experimental	31
4.9.1.	Análisis estadístico del estudio	31
4.9.2.	Modelo estadístico.....	32
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
5.1.	Estudio del tiempo de inmersión en BIT con explantes de jengibre <i>Zingiber officinale</i> R.....	33
5.2.	Estudio de la frecuencias de inmersión en BIT con explantes de jengibre <i>Zingiber officinale</i> R.....	36
5.3.	Estudio del volumen de medio utilizado en BIT con explantes de jengibre <i>Zingiber officinale</i> R.....	42
5.4.	Estudio de comparación de los tratamientos BIT vs medio semisólido en la micropropagación de jengibre <i>Zingiber officinale</i> R, mediante prueba de contraste de “T de student”	45
5.4.1.	Número de brotes, longitud de explante una semana después del establecimiento del ensayo.	45
5.4.2.	Número de brotes longitud de explante, 2 semanas después de iniciado el ensayo. 45	
5.4.3.	Número de brote, ancho de lámina foliar, longitud de raíces, longitud de explante 3 semanas después de iniciado el ensayo.....	45
5.4.4.	Número de brotes, longitud de brotes, número de hojas, longitud de lámina foliar, ancho de lámina foliar, número de raíces, longitud de raíces y del explante, relación parte aérea/raíz y diferencia de peso.....	46
6.	CONCLUSIONES	50
7.	RECOMENDACIONES	52
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
9.	ANEXOS	60

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1. Efecto del tiempo, frecuencia y volumen en la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, Roscoe) variedad gran caimán, en un biorreactor de inmersión temporal, Santa Clara, San Carlos. 28
- Cuadro 2. Promedio del número de brotes, en el estudio del volumen de medio utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán, Santa Clara, San Carlos, durante la semanas 4 de evaluación. 44

LISTA DE CUADROS DE ANEXOS

- Cuadro 1 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia, para la longitud del explante y el coeficiente de multiplicación en el estudio del tiempo de inmersión; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos. Evaluados una semana después de la siembra..... 61
- Cuadro 2 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud de brotes, longitud del explante, coeficiente de multiplicación, en el estudio del tiempo de inmersión; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados dos semanas después de la siembra. ... 61
- Cuadro 3 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud de brotes, número de hojas, longitud de lámina foliar y ancho de lámina foliar, en el estudio del tiempo de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados tres semanas después de la siembra. 62
- Cuadro 4 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para el número de raíces, longitud de explante y coeficiente de multiplicación, en el estudio del tiempo de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados tres semanas después de la siembra. 62
- Cuadro 5 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud de brotes, número de hojas, longitud de lámina foliar, ancho de lámina foliar y número de raíces, en el estudio del tiempo de inmersión; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados cuatro semanas después de la siembra..... 63
- Cuadro 6 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud de la raíz, longitud de explante, relación peso fresco parte aérea parte radical, incremento de peso fresco y coeficiente de multiplicación, en el estudio del tiempo de inmersión; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados cuatro semanas después de la siembra. 63
- Cuadro 7 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud del explante y coeficiente de multiplicación, en el estudio de la frecuencia de inmersión; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados una semana después de la siembra. 64
- Cuadro 8 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud de brotes, longitud del explante, coeficiente de multiplicación, en el estudio de la frecuencia de inmersión; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados dos semanas después de la siembra. ... 64
- Cuadro 9 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud de brotes, número de hojas, longitud de lámina foliar y ancho de lámina foliar en el estudio de la frecuencia de inmersión; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados tres semanas después de la siembra..... 65

- Cuadro 10 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para el número de raíces, longitud de raíces, longitud de explante y coeficiente de multiplicación, en el estudio de la frecuencia de inmersión; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados tres semanas después de la siembra..... 65
- Cuadro 11 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud de brotes, número de hojas, longitud de lámina foliar, ancho de lámina foliar y número de raíces en el estudio de la frecuencia de inmersión; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados cuatro semanas después de la siembra..... 66
- Cuadro 12 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud de raíces, longitud de explante, relación peso fresco parte aérea parte radical, incremento de peso fresco y coeficiente de multiplicación, en el estudio de la frecuencia de inmersión; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados cuatro semanas después de la siembra..... 66
- Cuadro 13 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud del explante y coeficiente de multiplicación, en el estudio del volumen de medio; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados una semana después de la siembra..... 67
- Cuadro 14 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud de brotes, longitud del explante, coeficiente de multiplicación, en el estudio del volumen de medio; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados dos semanas después de la siembra. ... 67
- Cuadro 15 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud de brotes, número de hojas, longitud de lámina foliar y ancho de lámina foliar en el estudio del volumen de medio; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados tres semanas después de la siembra..... 68
- Cuadro 16 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para el número de raíces, longitud de raíces, longitud de explante y coeficiente de multiplicación, en el estudio del volumen de medio; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados tres semanas después de la siembra..... 68
- Cuadro 17 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud de brotes, número de hojas, longitud de lámina foliar, ancho de lámina foliar y número de raíces, en el estudio del volumen de medio; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados cuatro semanas después de la siembra..... 69
- Cuadro 18 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud de raíces, longitud de explante, relación peso fresco parte aérea parte radical, incremento de peso fresco y coeficiente de multiplicación, en el estudio del volumen de medio; utilizando un biorreactor de inmersión

temporal sobre la micropropagación de jengibre (<i>Zingiber officinale</i> , R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados cuatro semanas después de la siembra.	69
Cuadro 19 A. Prueba T para la variable número de brotes y longitud de explante como respuesta a dos medios de cultivo, uno convencional y otro en biorreactores de inmersión temporal en el cultivo de jengibre, <i>Zingiber officinale</i> , Santa Clara San Carlos, una semana después de la siembra.	70
Cuadro 20 A. Prueba T para la variable número de brotes y longitud de explante como respuesta a dos medios de cultivo, uno convencional en medio semisólido y otro en biorreactores de inmersión temporal en el cultivo de jengibre (<i>Zingiber officinale</i>), Santa Clara San Carlos, dos semana después de la siembra.	70
Cuadro 21 A. Prueba T para la variable número de brote, ancho de lámina foliar, numero de raíces, longitud de raíces, longitud de explante, como respuesta a dos medios de cultivo, uno convencional y otro en biorreactores de inmersión temporal en el cultivo de jengibre, <i>Zingiber officinale</i> , Santa Clara San Carlos, tercera semana después de la siembra.	71
Cuadro 22 A. Prueba T para la variable número de brote, longitud del brote, número de hojas, longitud de lámina foliar, ancho de lámina foliar, número de raíces, longitud de raíces, longitud de explante, relación parte aérea/raíz, diferencia de peso como respuesta a dos medios, uno convencional y otro en biorreactores de inmersión temporal en el cultivo de jengibre, <i>Zingiber officinale</i> , Santa Clara San Carlos, cuarta semana después de la siembra.	71
Cuadro 23 A. Resultado del análisis de suelo sembrado de jengibre, <i>Zingiber officinale</i> Roscoe, el Coroso, de Guatuso, Alajuela, Costa Rica.	72
Cuadro 24 A. Número de nematodos fitoparásitos y de vida libre detectados en 100 g de suelo y 5 g de peso fresco de raíz en jengibre, <i>Zingiber officinale</i> , Roscoe, el Coroso de Guatuso,	72
Cuadro 25. Frecuencia, tiempo de inmersión y volumen de medio en sistemas de inmersión temporal en diferentes especies de interés agronómico. Recopilación de información.	73
Cuadro 26. Diferencias de costos y ganancias entre el sistema de biorreactores de inmersión temporal y método convencional utilizando 15 unidades BIT en un plazo de un mes.	74
Cuadro 27. Diferencias de costos y ganancias entre el sistema de biorreactores de inmersión temporal y método convencional utilizando 15 unidades BIT en un plazo de un mes.	74

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.* A) Mapa de Costa Rica, B) Localización de la comunidad del Coroso, que muestra la ubicación de la finca del productor, cantón de Guatuso, Alajuela, de donde se seleccionaron los rizomas de jengibre *Zingiber officinale*, variedad “gran caimán”..... 24
- Figura 2.* Distribución de los tratamientos utilizados en el estudio de las plantas de jengibre *Zingiber officinale* Roscoe, mediante el BIT. Tratamientos evaluados: A. Tiempo de inmersión. B. Frecuencia de inmersión. C. Volumen de medio. Con tres tratamientos (T1= tiempo de inmersión - T2= frecuencia de inmersión y T3= volumen de medio) y 4 repeticiones. 29
- Figura 3.* Unidad de un biorreactor de inmersión temporal (Bit), a) Filtro mili-poro de 0.22 μ m autoclavable. b) *Fitting* de plástico autoclavable, que conecta la parte interna con la externa de manera hermética. c) Tapa de rosca autoclavable. d) Manguera de silicona autoclavable. e) Frasco de plásticos transparentes autoclavable. 30
- Figura 4.* Longitud del explante de jengibre, *Zingiber officinale*, variedad gran caimán en el estudio de frecuencia de inmersión dos semanas después de la siembra. Santa Clara, San Carlos. 36
- Figura 5.* Longitud de la lámina foliar de brotes de jengibre, *Zingiber officinale*, variedad gran caimán en el estudio de frecuencia de inmersión, tres semanas después de la siembra. Santa Clara, San Carlos. 37
- Figura 6.* Longitud del explantes de jengibre, *Zingiber officinale*, variedad gran caimán en el estudio de frecuencia de inmersión tres semanas después de la siembra. Santa Clara, San Carlos. 38
- Figura 7.* Coeficiente de multiplicación en jengibre, *Zingiber officinale*, variedad gran caimán en el estudio de frecuencia de inmersión cuatro semanas después de la siembra. Santa Clara, San Carlos. 39
- Figura 8.* Longitud de brotes en jengibre, *Zingiber officinale*, variedad gran caimán en el estudio de frecuencia de inmersión cuatro semanas después de la siembra. Santa Clara, San Carlos. 40
- Figura 9.* Número de raíces de brotes en jengibre, *Zingiber officinale*, variedad gran caimán en el estudio de frecuencia de inmersión 4 semanas después de la siembra. Santa Clara, San Carlos. 41
- Figura 10.* Coeficiente de multiplicación en jengibre, *Zingiber officinale*, variedad gran caimán en el estudio de volumen de medio en BIT cuatro semanas después de la siembra. Santa Clara, San Carlos. 43
- Figura 11.* Número de brotes de jengibre, (*Zingiber officinale*) variedad gran caimán como respuesta a un medio líquido, BIT y a un medio semisólido, evaluado durante cuatro semanas. 47

Figura 12. Número de raíces en brotes de jengibre, (*Zingiber officinale*) variedad gran Caimán como respuesta a un medio líquido en BIT y a un medio semisólido, evaluado durante cuatro semanas..... 47

1. INTRODUCCIÓN

El jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), pertenece a la familia Zingiberacea. 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, p. 7). Como planta medicinal se usa en desórdenes digestivos y como antiinflamatorio (Srivastava y Mustafa, 1992, p 342). Se usa en quimio prevención, en cáncer colorectal (Zick, et al., 2015, p. 910), tiene además, actividad anticancerígena en metástasis (Park, 2002, p 240), y para el tratamiento del cáncer pancreático (Akimoto, Iizuka, Kanematsu, Yoshida, & Takenaga, 2015, párr. 3).

En Costa Rica, la mayor producción de jengibre proviene de la provincia de Alajuela, en los cantones de San Carlos y Guatuso (Alvarado, 2016, p. 5). Desde hace varios años los productores enfrentan limitaciones como uniformidad en el material de siembra e infestaciones del nematodo agallador, *Meloidogyne* spp. (Fernández y Quesada, 2009).

Los productores de jengibre han ido reduciendo el área de siembra, ya que este se ha visto afectado por un complejo de enfermedades similares que atacan el tiquisque (*Xanthosoma* spp.) llamado “mal seco”. Esta enfermedad, que se reportó ya hace más de 20 años, es una mezcla de bacterias y hongos, entre los cuales se encuentran *Pseudomonas* sp, *Erwinia solani*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium* sp. Este complejo de enfermedades redujo el área de siembra del tiquisque hasta un 75% y en muchos distritos, las siembras se eliminaron totalmente (Ministerio de Agricultura y Ganadería [MAG], 1994).

Los mercados internacionales han establecido nuevos requisitos en las características del rizoma de jengibre, lo que exige un cambio en el uso de insumos químicos por tecnologías limpias y amigables con el ambiente. La clonación del jengibre mediante tecnologías *in vitro*, permite obtener material de siembra, “limpio” de enfermedades y plagas (Palma y Matarrita, 1992, p. 49) y además clonar masivamente el cultivar “gran caimán” el cual es preferido por el mercado de los Estados Unidos, principal importador de este rizoma. (De exportadores Costarricenses IICA, 2003).

La técnica de micropropagación puede realizarse tanto en medios semisólidos como en medios líquidos, por medio de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT). Con la técnica SIT se reduce los costos de producción y permite la semi-automatización del proceso. Además, facilita la toma de los nutrientes por los explantes, ya que se evita la difusión a través del agar, las condiciones de cultivo son uniformes, permite obtener elevados coeficientes de multiplicación, se sustituyen fácilmente los medios de subcultivo sin cambio de envase y finalmente se reduce el tiempo de transferencia. El medio líquido de los SIT, permite la absorción rápida y eficiente por toda la superficie del tejido, influyendo en el desarrollo y estructura de éstos (Preil, 2005, p. 2).

La micropropagación del jengibre en medio semisólido, como método convencional, es una práctica ya establecida desde hace varios años (Palma y Matarrita, 1992, p. 49), pero el uso de técnicas mediante los BIT, con el fin de incrementar los coeficientes de clonación, no está documentado. Los BIT requieren establecer el tiempo de inmersión, la frecuencia y el volumen de medio en que las plántulas de jengibre deben estar en contacto con el medio líquido para establecer el debido protocolo.

El objetivo de la presente investigación, consistió en establecer el efecto del tiempo, frecuencia y volumen en la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, Roscoe) variedad gran caimán, en un biorreactor de inmersión temporal en Santa Clara, San Carlos.

2. OBJETIVOS

2.1. GENERAL

- ✓ Evaluar el efecto del tiempo, frecuencia y volumen del medio de cultivo en la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, Roscoe) variedad gran caimán, en un biorreactor de inmersión temporal, Santa Clara, San Carlos.

2.2. ESPECÍFICOS

- a. Evaluar el efecto del tiempo de inmersión sobre las siguientes variables: longitud de brotes, número de hojas, longitud de lámina foliar, ancho de lámina foliar, número de raíces, longitud de raíces, longitud de explante, relación peso fresco parte aérea parte radical, incremento de peso fresco y coeficiente de multiplicación, a través de biorreactores de inmersión temporal en el cultivo de jengibre.
- b. Cuantificar el efecto de la frecuencia de inmersión sobre las siguientes variables: longitud de brotes, número de hojas, longitud de lámina foliar, ancho de lámina foliar, número de raíces, longitud de raíces, longitud de explante, relación peso fresco parte aérea parte radical, incremento de peso fresco y coeficiente de multiplicación, a través de biorreactores de inmersión temporal en el cultivo de jengibre.
- c. Evaluar el volumen de medio de cultivo sobre las siguientes variables: longitud de brotes, número de hojas, longitud de lámina foliar, ancho de lámina foliar, número de raíces, longitud de raíces, longitud de explante, relación peso fresco parte aérea parte radical, incremento de peso fresco y coeficiente de multiplicación, a través de biorreactores de inmersión temporal en el cultivo de jengibre.
- d. Determinar el efecto del medio convencional y medio líquido en inmersión temporal sobre las siguientes variables: longitud de brotes, número de hojas, longitud de lámina foliar, ancho de lámina foliar, número de raíces, longitud de raíces, longitud de explante, relación peso fresco parte aérea parte radical, incremento de peso fresco y coeficiente de multiplicación.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

El jengibre es un cultivo de importancia comercial en Costa Rica, donde las principales áreas sembradas se localizan en la Región Huetar Norte y en la Zona Atlántica (Alvarado, 2016, p. 5). El rizoma y sus hojas de jengibre son atacados por muchas enfermedades causadas por hongos, bacterias, virus y micoplasmas. De estas enfermedades, las más problemáticas en las áreas en que se siembran son la pudrición causada por *Pythium* spp., el amarillamiento ocasionado por *Fusarium solanacerarum* y el marchitamiento cuyo agente patógeno es *Pseudomonas solanacearum* (Dake, 1995, p. 40). De estas enfermedades, *Fusarium* y *P. solanaceraum*, son las más importantes en Costa Rica (Morales, 2007, p. 7).

Para el control de estas enfermedades del jengibre los productos químicos no han demostrado su eficiencia e incluso hay evidencia de que *Fusarium solani* ha desarrollado resistencia al benomil, metil-1-(butilcarbamoil)-2-bencimidazol carbamato (Ramteke y Kamble, 2010, p. 233). Es necesario establecer un modelo que desarrolle tecnologías limpias y amigables con el ambiente. La herramienta biotecnológica de propagación *in vitro* del jengibre ha demostrado ser exitosa, ya que permite minimizar el riesgo de ataque de plagas y enfermedades del material de siembra, al someterlo a procesos de micropropagación por medio de métodos controlados. Resultando ser exitoso en Costa Rica (Palma y Matarrita, 1992, p. 50) como en otros países como China e India (Sharma and Singh, 1997, p. 70).

La micropropagación comprende una serie de técnicas de clonación de plantas en condiciones asépticas que inicia con el aislamiento de un pequeño segmento de tejido denominado “explante”. Los tejidos se siembran en un frasco que contiene un medio de cultivo, en donde se controla las condiciones físicas y químicas, lo que permite que las células expresen su totipotencialidad (Cruzat, 2009, p. 40). Por medio de la totipotencia las células diferenciadas se reorganizan volviendo a su estado meristemático y luego se rediferencian mediante la organización de sus células y formación de brotes, conservando las características genéticas de la planta madre (Bhojwani y Dantu, 2013, p. 65).

La micropropagación aplicada al cultivo de jengibre, demuestra ser una herramienta exitosa; no obstante, el uso de esta técnica que utiliza medios de cultivo semisólidos no

permite obtener un número alto de plántulas, suficientes para satisfacer un mercado que se expande continuamente y que cada vez exige más calidad (Cruzat, 2009, p. 40). Sobre este tema, Hernández, Gatica y Alvarenga, (2008) intentaron aumentar el coeficiente de multiplicación, micropropagando jengibre en medios de cultivo dispensados en vasos fermentadores de bajo costo, sin embargo, el número de plántulas no fue significativamente superior al obtenido en medios semisólidos.

Los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT), en los que se incluyen los Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) que utilizan dos frascos que impulsan el medio de cultivo líquido, mediante la aplicación de un flujo de aire a uno de sus frascos. Lo anteriormente expuesto, mediante el principio Pascal. Esto permite el traslado del medio líquido de uno de los frascos al otro por medio de una manguera. Y así los tejidos que se bañan en un plazo de tiempo automatizado, luego se devuelve aplicando presión contraria, de tal manera que los BIT se constituyen en una opción complementaria a los métodos convencionales de medios semisólidos (Gruzat, 2009, p. 40).

Los BIT permiten obtener coeficientes de multiplicación elevados, disminuyendo los costos de producción, además, de semiautomatizar el proceso de micropropagación. Mediante el BIT se facilita la toma de nutrimentos por los explantes, al no tener un medio sólido que limita su difusión, las condiciones de cultivo son uniformes y el medio puede ser sustituido sin cambio de recipiente, haciendo más eficiente el tiempo de transferencia. El medio de cultivo se distribuye en el tejido de las plántulas a manera de una capa muy fina, lo que acelera el desarrollo de sus estructuras (Preil, 2005, p. 2).

Basail, et al., (2012) determinó una respuesta heterogénea en las plántulas producidas *in vitro*, utilizando BIT y ajustando las variables físico-químicas que influyen en el número y el vigor de las plántulas (p. 54).

El método de aplicación de BIT consiste en la esterilización por calor, mediante el uso de frascos de cultivo unidos por medio de mangueras de plástico transparente, que permita su esterilización mediante calor. Las mangueras que conducen el medio de cultivo y oxígeno son conectadas a través de un filtro miliporo para garantizar la esterilización del aire (Pérez, et al., 2001, p 18).

Es necesario ajustar la frecuencia y el tiempo en que las plantas están en contacto con el medio de cultivo. Esto se regula mediante un “timer” conectado a válvulas solenoides que al abrirse trasladan el medio de cultivo líquido al segundo frasco, que contiene los explantes (Ackermann, Bruschi, Sonntag y Sellner, 2003, p. 48).

Los BIT permiten que los explantes estén sumergidos en el medio nutritivo por un lapso de tiempo controlado, así pueden absorber los nutrientes en toda su superficie (Alvard, Cote y Teisson, 1993, p 55).

La micropropagación, mediante los BIT, incluye un mayor contacto del medio de cultivo con los tejidos y no existe limitación de intercambio de los gases fundamentales en los procesos fisiológicos. Se controla la composición, tanto del medio de cultivo como el de la atmósfera, dentro del BIT, este conjunto de ventajas se traduce en un mayor número de plantas vigorosas (Ziv, 1995, p 25).

La técnica BIT, al igual que los sistemas convencionales, incluye cuatro etapas, a saber: el establecimiento aséptico, la multiplicación o proliferación de brotes, el alargamiento de los brotes y por último, la aclimatación o endurecimiento. La principal diferencia entre el cultivo *in vitro* convencional y el BIT, se produce en la etapa de multiplicación con un medio líquido y el contacto del medio de cultivo con los tejidos; se realiza de una manera intermitente y más oxigenada. Como resultado, se utiliza una mayor cantidad de explantes por recipiente (Cruzat, 2009, p. 40).

Para el funcionamiento efectivo de un BIT, se deben considerar tanto las condiciones químicas óptimas de cultivo así como los factores físicos, tales como temperatura, humedad relativa y luz, en sus tres aspectos; intensidad, calidad y duración (Ackermann, et al., 2003, p. 48).

El éxito de la micropropagación en los BIT depende de diferentes factores que se enumeran continuación: 1) El volumen del frasco del cultivo, y el medio líquido en relación a la biomasa del explante a la iniciación y subsecuente estado del cultivo. 2) El régimen de inmersión al cual el cultivo está sujeto y 3) el efecto que cada uno de los parámetros tiene el uno sobre el otro (Watt, et al., 2012 p 14031).

En los sistemas BIT el tiempo de inmersión es importante ya que controla la absorción de nutrimentos y la expresión de hiperhidricidad (Berthouly, Etienne, 2005, p 179). Los tiempos de inmersión usados en diferentes investigaciones varía considerablemente debido probablemente a la gran variedad de especies, los procesos de micropropagación y el sistema de inmersión usado (Berthouly, Etienne, 2005, p 179). Tiempos de inmersión para tuberización *in vitro* de papa de 1 hora cada 6 horas mostró ser eficiente, mientras que los tiempos cortos de inmersión en café de 1 minuto cada 6 horas estimularon la producción de embriones somáticos en café (Berthouly, Etienne, 2005, p 179).

Se debe optimizar el volumen de medio líquido en los frascos BIT si se quiere que estos sistemas de cultivo funcionen eficientemente (Berthouly y Etienne, (2005). Lorenzo et al, (1998), p199, encontraron un volumen óptimo de medio de cultivo líquido para la caña de azúcar y obtuvieron un incremento en la tasa de multiplicación desde 8,3 brotes hasta 23.9 brotes por 30 días cuando se aumentó el volumen de medio desde 5 ml hasta 50 mL, no obstante el volumen de medio usado no aumentó la longitud de los brotes formados.

Para todos los sistemas de inmersión temporal el volumen del recipiente es mucho mayor que los frascos usados en medios semisólidos. En los sistemas de inmersión temporal se usan frascos que van de 1 a 20 litros y se ha demostrado que el tamaño (7 litros) tiene un efecto positivo en la micropropagación comparados con los medios de cultivos gelificados (Krueger, et al. 1991 p 25).

La micropropagación en los sistemas BIT incrementa la absorción de nutrientes lo que promueve el crecimiento de los tejidos; pero se puede presentar hiperhidricidad ya que el continuo contacto de los tejidos de las plantas puede ser total o parcial lo que ocasiona que el tejido se hidrata en demasía según Deberg, et al. (1981) p. 185. La hiperhidricidad o vitrificación se caracteriza por diferentes grados de desórdenes morfológicos y fisiológicos y que se manifiestan como una vitrificación, apariencia acuosa de los tejidos, desórdenes en el crecimiento de los brotes más específicamente en las hojas (Ziv, 1995, p 27).

Bhatia S., K. Sharma, (2015), p 395, indican que las principales causas de la hiperhidricidad en el cultivo *in vitro* son: el estrés oxidativo, resultado de la alta concentración de sales, el tipo de explante utilizado, la concentración de microelementos, el desbalance de reguladores del crecimiento, la baja intensidad de luz, la alta humedad

relativa, la acumulación de gas en la atmósfera del frasco, la concentración y tipo de agar, la alta concentración de amonio, y en medios líquidos cuando las plantas crecen en un medio carente de un agente gelificante; agregan que la hiperhidricidad puede controlarse monitoreando la atmósfera modificada del frasco de cultivo, usando membranas permeables al gas para incrementar el intercambio de vapor de agua y otros gases tales como el etileno del medio ambiente, el uso de altas concentraciones de agente gelificante para reducir el riesgo de hiperhidricidad, adición de agar hidrolizado, usar la citocinina, “meta-topolin (6-3-hidroxi-bencilamino) purina, combinar una concentración baja de citocinina con el nitrato de amonio en el medio de cultivo, usar nitrato o glutamina como una fuente de nitrógeno y disminuir la relación de amonio: nitrato en el medio de cultivo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación del proyecto

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación en Agroindustria, Biotecnología y Veterinaria (CIABIV) de la Escuela Técnica Agrícola e Industrial (ETAI), Santa Clara, San Carlos, Alajuela. Periodo de estudio 2017-2018.

4.2. Material experimental

Se realizó una selección de rizomas de la variedad “gran caimán” en la comunidad El Coroso, cuyas coordenadas geográficas medias están dadas por 10° 42' 22" latitud norte y 84° 49'57', longitud oeste, y localizado a 80 msnm. El Coroso es una comunidad de agricultores ubicada a 21 km del distrito Central San Rafael, del cantón de Guatuso en Alajuela (Figura 1).

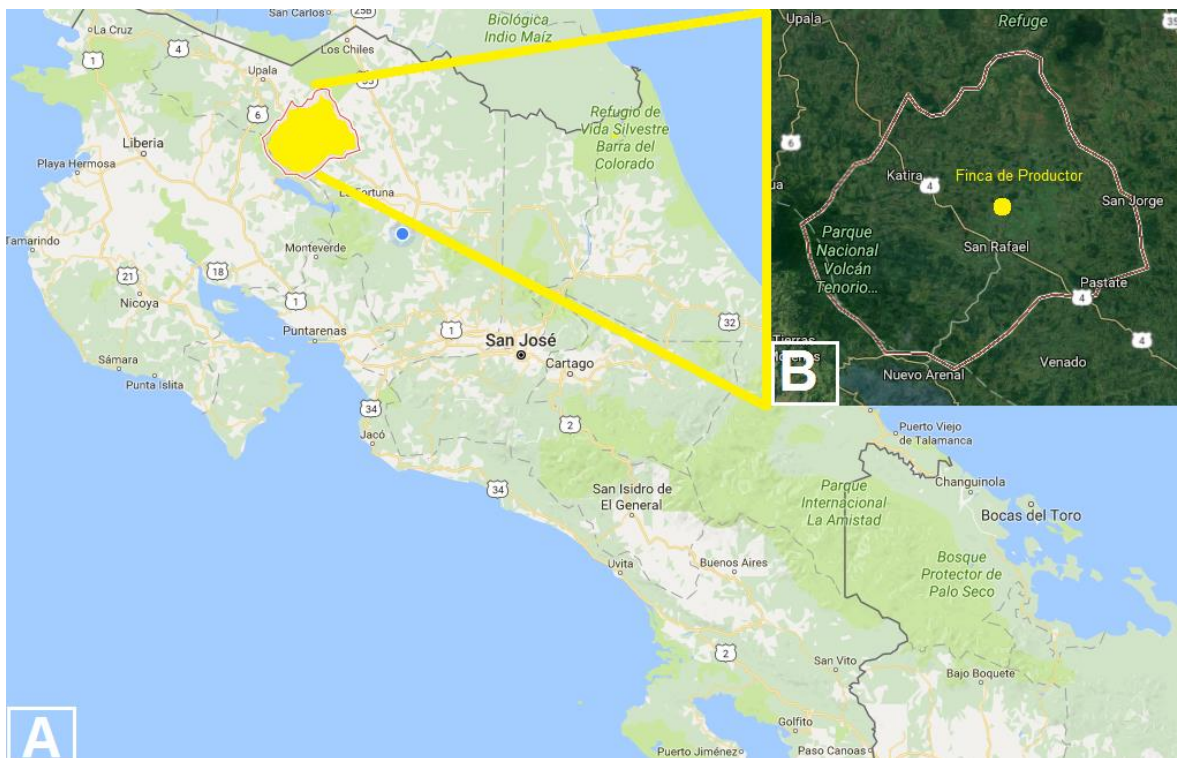


Figura 1. A) Mapa de Costa Rica, B) Localización de la comunidad del Coroso, que muestra la ubicación de la finca del productor, cantón de Guatuso, Alajuela, de donde se seleccionaron los rizomas de jengibre *Zingiber officinale*, variedad “gran caimán”.

4.3. Selección del rizoma y preparación de los explantes para la siembra *in vitro*

Los rizomas se seleccionaron junto con el productor del Coroso de Guatuso, considerando las características de vigor, sanidad y tamaño. Los rizomas seleccionados se trasladaron al laboratorio en donde se les removió todo residuo de suelo, se utilizó un cepillo de cerdas suaves, un jabón líquido neutro y se removió las capas de corcho que cubre a las yemas que inician su desarrollo. Posteriormente se realizaron varios lavados vigorosos con el fin de remover todo residuo de jabón.

4.4. Fase I. Establecimiento aséptico.

Una vez lavados, a los rizomas limpios se les disectaron las yemas de aproximadamente 1 cm de diámetro. Seguidamente se inició la fase I de desinfección, mediante inmersión de las yemas en alcohol de 96° durante 1 minuto, más dos gotas de *tween* 20, lo que permitió una mayor superficie de contacto del alcohol con el tejido y garantizó una eficiente desinfección. Posteriormente, las yemas se trasladaron a una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl al 3 %), durante 15 minutos. A esta solución también se le agregó 1 gota de *tween* 20 por cada 100 ml de cloro. Estos procesos de desinfección se llevaron a cabo en un agitador ultrasónico.

Las yemas se trasladaron a una cámara de flujo laminar, en donde se le practicó tres lavados con agua destilada estéril; con el fin de remover los residuos de cloro. Finalmente, las yemas se redujeron a 5 mm de diámetro en la base y se sembró en un medio de cultivo que contenía las sales Murashige y Skoog (MS) suplementado con 3 mg/L de bencil adenina (BA) y 1 mg/L de ácido naftalen acético (ANA). En la introducción se utilizaron tubos de ensayo de 15 cm de longitud y 2.5 cm de diámetro con un volumen de 15 mL de MS.

4.4.1. Medio de cultivo

Los medios de cultivo se usaron en dos estados, uno solidificado con gellam gum® en el método convencional y otro en estado líquido, cuando se utilizó el BIT. En el método tradicional para iniciar la siembra de yemas, se usó el medio de cultivo con las sales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962) enriquecido con 30 g/l de sacarosa y suplementado con 3 mg/L de benciladenina (BA) y 1 mg/L de ácido naftalenacético (ANA). El pH se

ajustó a 5,7 y posteriormente el medio se solidificó con gellam gum ®, a razón de 3 g/L. Se dispensó 15 ml de medio de cultivo en tubos de 15 cm de largo por 2,5 cm de ancho, que se esterilizaron en autoclave (20 minutos /litro de medio, 121 °C y una presión de 15 psi).

4.4.2. Medio de cultivo para BIT

El medio de cultivo dispensado en el sistema de biorreactores de inmersión temporal fue el mismo al que se usó en medio semisólido, en esta ocasión carente de gellam gum®.

4.5. Fase II. Estímulo de brotes preformados y adventicios

La segunda fase de la micropropagación consistió en el estímulo de brotes preformados y adventicios, ejecutada un mes después de la fase I. Los brotes de esta fase se subcultivaron en contenedores plásticos de 11.5 cm de diámetro y 10.5 cm de longitud que contenían 75 mL de sales de MS. Esta condición se mantuvo durante 1 mes. Pasado este tiempo se subcultivaron a contenedores de plástico, que se utilizaron para llevar a cabo los experimentos en el biorreactor de inmersión temporal, con el que se determinó el tiempo, la frecuencia de inmersión y el volumen de medio.

4.6. Tratamientos para evaluar la respuesta del jengibre en un Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT)

Para determinar las respuestas del jengibre en BIT, se ejecutaron cuatro experimentos con los que se seleccionaron, el mejor tiempo, la mejor frecuencia de inmersión, el mejor volumen de medio y una comparación del sistema BIT, con el método convencional en medio semisólido. En cada uno de estos experimentos se evaluaron tres tratamientos que se describen a continuación.

4.6.1. Tiempo de inmersión

En el estudio, para determinar el mejor tiempo de inmersión (5, 10, y 15 minutos) se utilizó como constante el volumen de medio. En esta etapa de multiplicación el volumen fue de 400 mL por BIT (40 mL por planta). Se utilizaron 10 explantes por recipiente de cultivo, con cuatro repeticiones. La frecuencia de inmersión fue de 12 horas y se consideró como constante para cada tiempo de inmersión. Los explantes se mantuvieron en el medio de cultivo durante un mes en esta etapa (Cuadro 1).

4.6.2. Frecuencia de inmersión

Se evaluaron tres frecuencias de inmersión: el primero consistió en cuatro inmersiones cada tres horas, el segundo en dos inmersiones cada 12 horas y el tercero en 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 que multiplicado por 10 explantes como unidad experimental, requirió un volumen total de 400 mL por frascos BIT (Cuadro 1).

4.6.3. Volumen del medio de cultivo

En esta etapa se evaluaron tres volúmenes de medio, 30,40 y 50 mL por explante. Cada 10 explantes conformaron una unidad experimental. De tal modo que por cada tratamiento se dispensaron 300 mL, 400 mL y 500 mL por unidad BIT. El tiempo y frecuencia de inmersión se seleccionaron de los ensayos, donde se cuantificaron los mejores de coeficientes de multiplicación de brotes. Cada semana se evaluaron los tratamientos que se repitieron durante cuatro semanas. Los explantes se mantuvieron en medio de cultivo durante un mes en esta etapa (Cuadro 1).

4.6.4. Evaluación de medios de cultivo en BIT vs medios solidificados

El medio de cultivo en frascos BIT en donde se consideraron el tiempo, la frecuencia de inmersión y el volumen de medio que mejores resultados mostraron en los tres experimentos anteriores, se comparó con medios de cultivos solidificados con agar. Durante cuatro semanas se evaluaron los dos tratamientos.

4.7. Condiciones físicas del cuarto de crecimiento

En todos los casos, el cuarto de crecimiento contó con las siguientes condiciones físicas; el fotoperiodo fue de 16 horas, la temperatura se reguló mediante aire acondicionado a $27 \pm 3^{\circ}$. La intensidad lumínica fue de 3000 lux y la humedad relativa fue de 80%.

Cuadro 1. Tratamientos para estudiar el efecto del tiempo, frecuencia y volumen en la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, Roscoe) variedad gran caimán, en un biorreactor de inmersión temporal, Santa Clara, San Carlos.

Experimento	Tratamientos	Observaciones
TIEMPO DE INMERSIÓN	5 min	Para cada tiempo de inmersión (5, 10 y 15 min) se consideró como constante el volumen de medio de cultivo con 40 mL/explante que multiplicado por 10 explantes como unidad experimental, generó un volumen de 400 mL por frasco. La frecuencia de inmersión fue de 12 horas y se consideró como constante para cada tiempo de inmersión.
	10 min	
	15 min	
FRECUENCIA DE INMERSION	4 cada 6 horas	Para determinar la frecuencia de inmersión, en este segundo experimento, se utilizó el mejor tiempo de inmersión del experimento anterior y se utilizó como constante el volumen de 40 mL/explante que multiplicado por 10 explantes como unidad experimental, generó un volumen de 400 mL por frasco.
	2 cada 12 horas	
	1 cada 24 horas	
VOLUMEN DE MEDIO	20 mL	En este tercer experimento se utilizó el mejor tiempo y frecuencia de inmersión de los dos experimentos anteriores para evaluar el mejor volumen de medio (20,40 y 60 mL/explante)
	40 mL	
	60 mL	

4.8. Sistema de inmersión temporal para micro propagación de jengibre

El sistema de cultivo a través de Biorreactores de Inmersión temporal (BIT) se instaló en el laboratorio de Biotecnología del CIAVIB, según el diagrama que se muestra en la Figura 2.

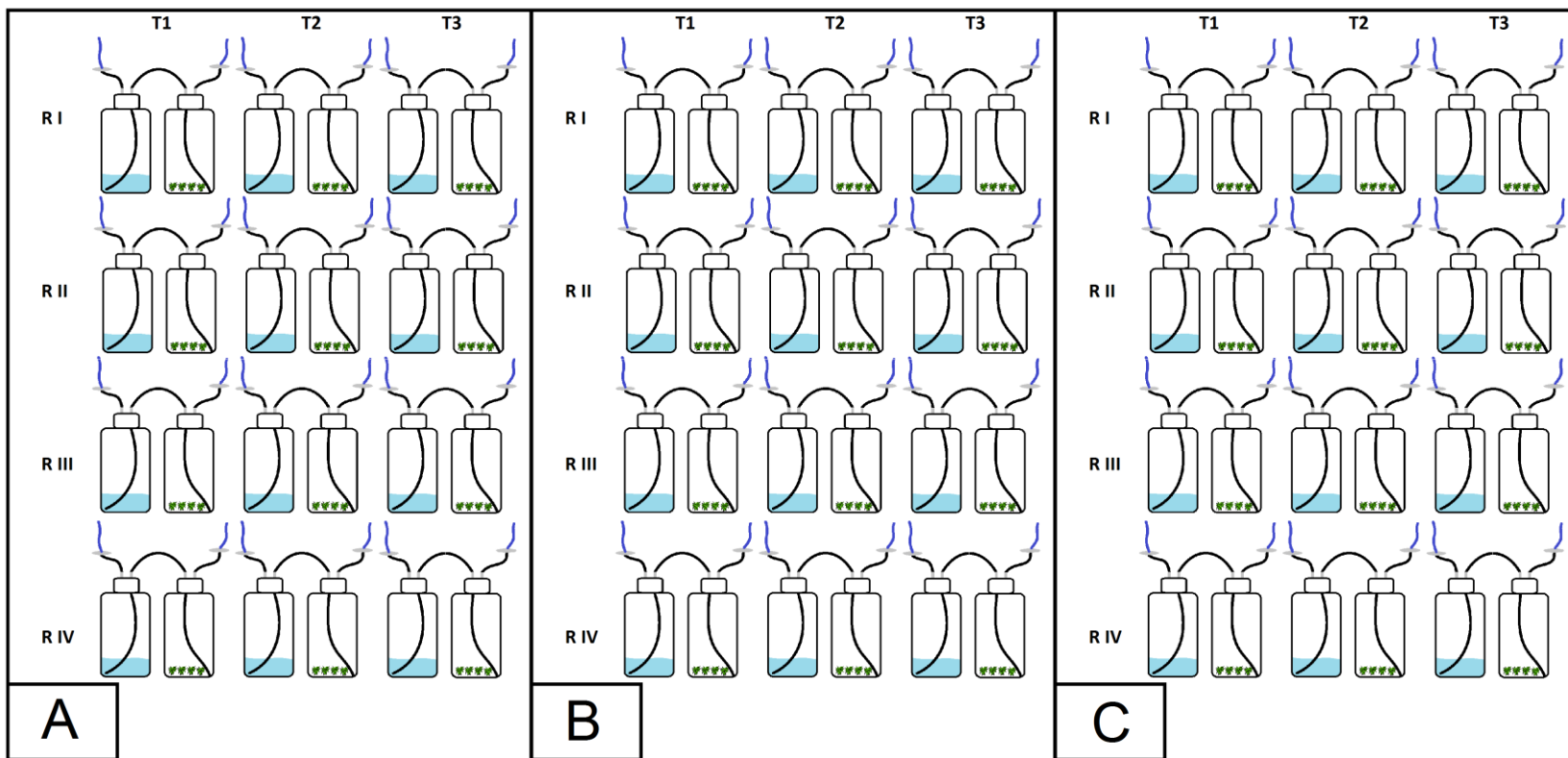


Figura 2. Distribución de los tratamientos utilizados en el estudio de las plantas de jengibre *Zingiber officinale* Roscoe, mediante el BIT. Tratamientos evaluados: A. Tiempo de inmersión. B. Frecuencia de inmersión. C. Volumen de medio. Con tres tratamientos (T1= tiempo de inmersión - T2= frecuencia de inmersión y T3= volumen de medio) y 4 repeticiones.

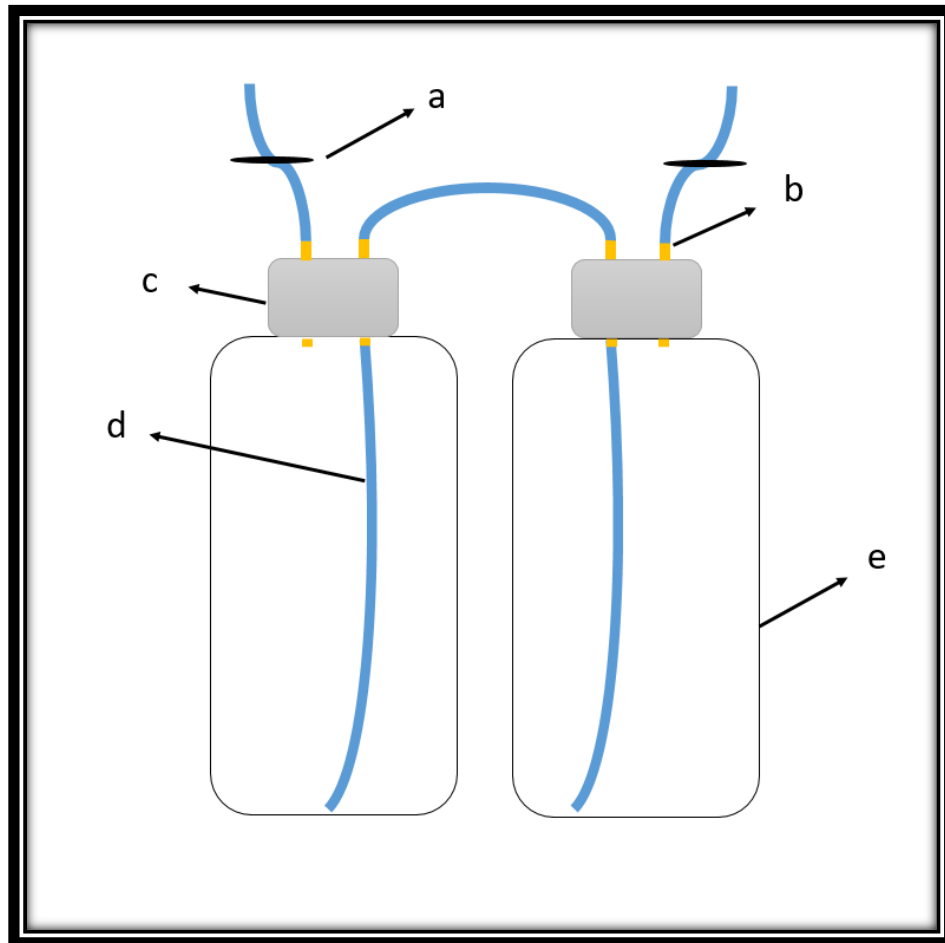


Figura 3. Unidad de un biorreactor de inmersión temporal (Bit), a) Filtro mili-poro de $0.22\mu\text{m}$ autoclavable. b) *Fitting* de plástico autoclavable, que conecta la parte interna con la externa de manera hermética. c) Tapa de rosca autoclavable. d) Manguera de silicona autoclavable. e) Frasco de plásticos transparentes autoclavable.

La unidad BIT consistió de dos frascos Nalgene® de 2000 ml de capacidad, uno de los frascos se destinó al crecimiento de los brotes preformados y adventicios, al otro frasco se le dispensó el medio de cultivo. Cada frasco se conectó mediante mangueras de silicona a un sistema de aire proveniente de un compresor libre de aceite De Watt® que se calibró para que se mantenga a una presión constante de 15 psi, el cual se accionó por electroválvulas neumáticas y un programador

automático “Timer” el cual tiene la función de controlar los BIT según lo deseado de acuerdo con los tratamientos.

4.9. Diseño experimental

Se realizaron cuatro experimentos, en los tres primeros se utilizó un diseño completamente al azar, con cuatro repeticiones por tratamiento y 10 plántulas de jengibre por unidad experimental.

4.9.1. Análisis estadístico del estudio

Para los cuatro experimentos, se realizó un análisis de varianza mediante el programa *Statistical Analysis System* (SAS). Este, de resultar significativo o altamente significativo, los promedios de resultado de tratamiento se ajustarán a un modelo de regresión con el fin de explorar y cuantificar la relación de dependencia entre las variables de respuesta del jengibre o variable cuantitativa y las variables independientes en este caso el tiempo, frecuencia y volumen de medio de cultivo.

Una vez determinado el protocolo, tiempo de inmersión, frecuencia de inmersión y volumen de medio en los BIT, se estableció un estudio por medio de la prueba de *T de student*, diseñada para examinar las diferencias entre el protocolo de micropropagación de jengibre establecido en el BIT y el determinado para medios semisólidos, en contenedores denominados “tina” como muestras independientes.

Variables evaluadas

En los sistemas de inmersión temporal tipo BIT, se realizaron tres experimentos, con el fin de determinar la frecuencia, el tiempo y el volumen de inmersión. Luego, se realizó un experimento más para la comparación del medio semi-solidao (convencional) con el medio líquido (BIT). Las variables se midieron semanalmente, durante un mes y se enumeran a continuación.

- a. Longitud de brotes
- b. Número de hojas
- c. Longitud de lámina foliar

- d. Ancho de lámina foliar
- e. Número de raíces
- f. Longitud de raíces
- g. Longitud de explantes
- h. Relación parte aérea / raíz
- i. Incremento de peso
- j. Coeficiente de multiplicación

En los medios de cultivo semisólidos, semanalmente se cuantificaron las mismas variables anteriores, con el fin de realizar una comparación mediante la prueba *T de student*. Los instrumentos que se utilizaron para cuantificar las variables fueron las siguientes: una balanza analítica y una regla graduada milimétrica o calibrador digital.

4.9.2. Modelo estadístico

El modelo estadístico que consideró el tiempo de inmersión, la frecuencia de inmersión y el volumen de medio fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + M_i + E_{ij}$$

En donde:

Y_{ij} = Variable de respuesta

μ = Media general

M_i = Efecto del tiempo de inmersión, frecuencia de inmersión y volumen de medio

E_{ij} = Error experimental

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Estudio del tiempo de inmersión en BIT con explantes de jengibre *Zingiber officinale* R.

Las variables, longitud de brotes, número de hojas, longitud de lámina foliar, ancho de lámina foliar, número de raíces, longitud de raíz, longitud de explante, relación peso fresco parte aérea parte radical, incremento de peso fresco y coeficiente de multiplicación, evaluadas durante cuatro semanas tal y como se establecen en los cuadros 1 A, 2 A, 3 A, 4 A, 5 A y 6 A, como respuesta a tres tiempos de inmersión (5, 10 y 15 minutos) no mostraron diferencias estadísticas.

El tiempo de inmersión influye según el estado de desarrollo de las plántulas, además de la renovación de la atmósfera interna del BIT y la absorción de nutrientes del medio líquido; por esta razón es necesario establecer el tiempo de inmersión según la fase de cultivo que satisface las necesidades del material vegetal (Escalona, 2006).

En cultivos tropicales tales como el banano gran enano (AAA), los coeficientes de multiplicación fueron de 7,5 con inmersiones del medio de cultivo líquido cada dos minutos y frecuencias de inmersión cada cuatro horas. Cuando las inmersiones fueron de 20 minutos, cada cuatro horas, el coeficiente de multiplicación fue de ocho, utilizando recipientes de ocho litros de capacidad (Colmenares y Jiménez, 2003).

La duración del tiempo de inmersión se ajustó según la especie, cultivar y método de propagación que se utilice, ya que una de las respuestas que controla la duración del tiempo de inmersión es la hiperhidricidad, lo cual se ha demostrado, limita el desarrollo de esquejes en la micropropagación de *Coffea arabica*. En esta especie se observó poca hiperhidricidad cuando el tiempo de inmersión fue de 15 minutos, mientras que con tiempos mayores a ese valor, se manifestaron síntomas de hiperhidricidad en los tejidos (Etienne y Berthouly, 2002).

Es necesario cuantificar el tiempo de inmersión para cada una de las especies y fases en que se evalúa el cultivo en la micropropagación, estos factores contribuyen en gran medida a la eficiencia de los BIT (Escalona, 2006).

La presencia de brotes de jengibre de este estudio, fue evidente a partir de la segunda semana de evaluación. La mayoría de estos brotes no superaron los 5 mm de longitud. Durante este periodo de evaluación también se determinó la longitud del brote y la longitud del explante (Cuadro 2 A).

A partir de la tercera semana, después de la siembra, emergieron más brotes y raíces. Además, se evaluó el número de hojas y la longitud de lámina foliar tal (Cuadro 3 A).

En la tercera semana de evaluación ninguna de las variables evaluadas mostraron diferencias estadísticas.

En la cuarta y última semana de evaluación de los tiempos de inmersión, se consideraron dos variables más; la relación peso fresco aéreo /peso fresco de las raíces e incremento del peso fresco total de la parte aérea y raíz. El análisis de varianza no mostró diferencias estadísticas para las 10 variables consideradas en este estudio, como respuesta a los tres tiempos de inmersión evaluados durante cuatro semanas después de iniciado el estudio (Cuadros 5 A y 6 A).

Se ha determinado que, prolongados periodos de inmersión, afectan el desarrollo del material vegetal por causa de un incremento en la hiperhidricidad y estrés oxidativo Martre et al., (2001). En el trabajo de Roels et al., (2005) los brotes de plátano presentaron hiperhidricidad, además de una inferior longitud y menor número de hojas, cuando los tiempos de inmersión se incrementaron de 12 a 22 minutos. Por tal razón, en el presente estudio se consideró el menor tiempo de inmersión (5 minutos) como el recomendable para la micropropagación del jengibre mediante BIT y así prevenir el problema de hiperhidricidad.

La hiperhidricidad o vitrificación, se reconoce por una malformación de hojas y tallos que presentan aspecto vítreo, debido a largos periodos de inmersión temporal o continuo contacto en el medio. Entre las principales malformaciones se cita la dificultad del cierre de los estomas, anomalías en tejidos vasculares y epidérmicos, afección de fotosíntesis, lo que resulta en plantas que no se adaptan al trasplante *ex vitro* (Ziv, 2002).

El tiempo de inmersión es considerado un factor importante en la respuesta morfogénica del material vegetal a micropropagar. En el cultivo de la piña (*Ananas comosus* (L) Merr.) Escalona et al., (1999) encontraron que con un tiempo de inmersión de dos minutos y una frecuencia de tres

horas, se incrementó el coeficiente de multiplicación y por lo tanto se facilitó una mayor eficiencia en la asimilación de nutrientes por los explantes.

En estudios realizados por Stanly et al., (2011) en *Curcuma zeodaria* y *Zingiber zerumbe*, dos especies pertenecientes a la familia Zingiberácea, a la que pertenece el jengibre, se utilizaron tres sistemas de micropropagación, que consistieron en: un medio semisólido, un medio en agitación y un sistema de inmersión temporal. El tratamiento que resultó más eficiente fue el sistema de inmersión temporal, ya que además de controlar la vitrificación, fue con el que se obtuvo el mayor coeficiente de multiplicación en las dos especies de Zingiberaceas estudiadas.

Berthouly y Etienne, (2005) y Escalona (2006), manifestaron la necesidad de determinar el tiempo de inmersión para cada una de las especies tropicales, pues del ajuste del tiempo de inmersión depende en gran medida, la eficiencia del empleo de los BIT.

En estudios realizados en tres especies de *Rhodophiala* en BIT, la hiperhidricidad aumentó ocho veces comparado con las especies de *Rhodophiala* que se desarrollaron en medios semi-sólidos (Muñoz, 2006).

Para la optimización de la micropropagación mediante los BIT, también se debe regular el tiempo de inmersión, ya que es un factor fundamental para prevenir la vitrificación, de tal manera que no se recomiendan tiempos muy prolongados para los sistemas BIT. Estas razones fundamentan que el tiempo de inmersión seleccionado en el presente estudio es el de cinco minutos. Los brotes que se formaron en este tratamiento no mostraron síntomas de hiperhidricidad. Similares resultados obtuvieron Martre et al., (2001), cuando trabajaron con callos de *Hevea brasiliensis*.

5.2. Estudio de la frecuencias de inmersión en BIT con explantes de jengibre *Zingiber officinale* R.

Al evaluar el efecto de tres frecuencias de inmersión (6 horas, 12 horas y 24 horas), no se cuantificaron diferencias estadísticas en las variables longitud de explante y coeficiente de multiplicación una semana después de la siembra (Cuadro 7 A).

Dos semanas después de la siembra, los explantes mostraron brotes que fueron cuantificados en su número y longitud. Se continuó además, midiendo la longitud del explante. No se encontró diferencias estadísticas al evaluar la longitud y el coeficiente de multiplicación, pero sí se encontró diferencias estadísticas, cuando se midió la longitud del explante como respuesta a la frecuencia de inmersión (Cuadro 8 A).

La tendencia de longitud del explante, como respuesta a la frecuencia de inmersión en el medio nutritivo, se ajustó mediante una ecuación de regresión lineal (Figura 4), evaluado dos semanas después de la siembra. En esta línea de regresión se observó un incremento en la longitud del explante al aumentar la frecuencia de inmersión hasta 24 horas.

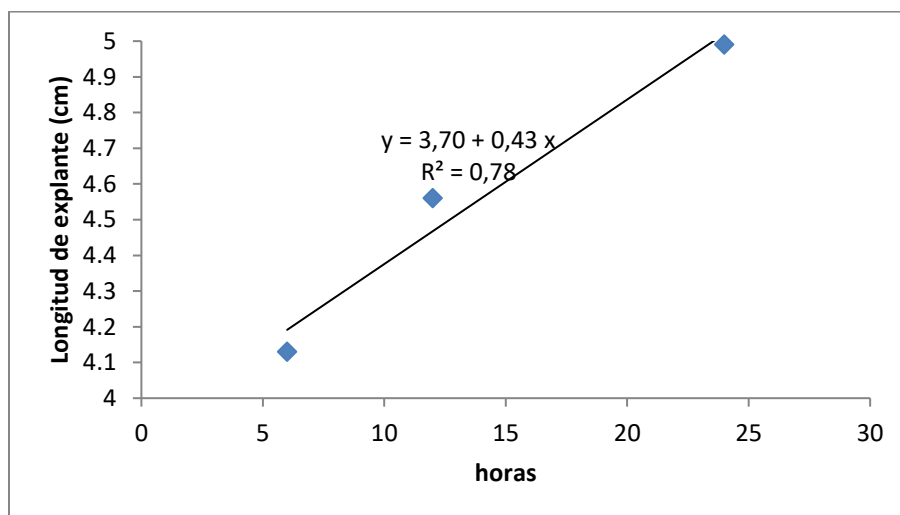


Figura 4. Longitud del explante de jengibre, *Zingiber officinale*, variedad gran caimán en el estudio de frecuencia de inmersión dos semanas después de la siembra. Santa Clara, San Carlos.

La tendencia de longitud del explante, como respuesta a la frecuencia de inmersión, se ajustó a una ecuación de regresión lineal en la que se observó un incremento en la longitud del explante al aumentar la frecuencia de inmersión hasta 24 horas (Figura 4).

Para el estudio de tres frecuencias de inmersión temporal, tres semanas después de la siembra, únicamente se encontraron diferencias estadísticas para las variables, longitud de lámina foliar y longitud de explante (Cuadro 9 A). La longitud de la lámina foliar (Figura 5) y del explante (Figura 6) se ajustaron a una ecuación de regresión lineal.

Durante la tercera semana de evaluación, se encontraron diferencias estadísticas cuando se midió la longitud del explante, como respuesta a la frecuencia de inmersión (Cuadro 10 A).

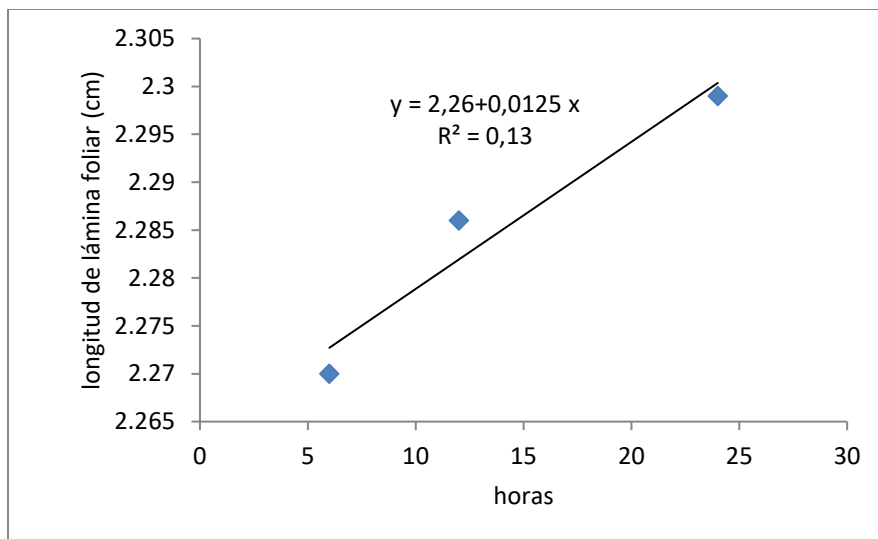


Figura 5. Longitud de la lámina foliar de brotes de jengibre, *Zingiber officinale*, variedad gran caimán en el estudio de frecuencia de inmersión, tres semanas después de la siembra. Santa Clara, San Carlos.

La longitud de la lámina foliar y su respuesta a la frecuencia de inmersión, se ajustó a una ecuación de regresión lineal creciente, de tal manera que al aumentar la frecuencia de inmersión, aumentó la longitud de la lámina foliar. Sin embargo, el coeficiente de regresión, que fue de 0,13, no es confiable; al correlacionar la longitud de la lámina foliar con la frecuencia de inmersión (Figura 5).

Un aumento de la longitud del explante, como respuesta a la frecuencia de inmersión no es conveniente. Ya que al aumentar la longitud del explante es probable que haya un aumento en la cantidad de auxina endógena, lo que favorece la relación auxina/citocinina en favor de la auxina, hecho que inhibe el estímulo de brotes de la base del explante (Skoog y Miller, 1957).

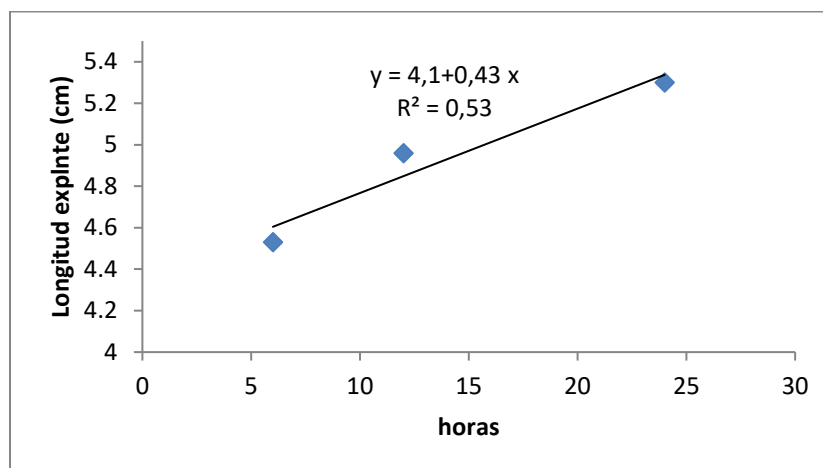


Figura 6. Longitud del explantes de jengibre, *Zingiber officinale*, variedad gran caimán en el estudio de frecuencia de inmersión tres semanas después de la siembra. Santa Clara, San Carlos.

La longitud del explante como respuesta a la frecuencia de inmersión, cuantificado en la tercera semana después de la siembra, se ajustó a una ecuación de regresión lineal creciente (Figura 6) sin embargo, el R^2 que es igual a 0,53.

Cuatro semanas después de establecido el estudio de frecuencias de inmersión temporal en jengibre, se encontraron diferencias estadísticas cuando se evaluaron la longitud de brotes, el número de raíces y el coeficiente de multiplicación (Cuadro 11 A y 12 A). Cada una de estas tres variables se ajustó a líneas de regresión lineal que se registran en las figuras 7, 8 y 9.

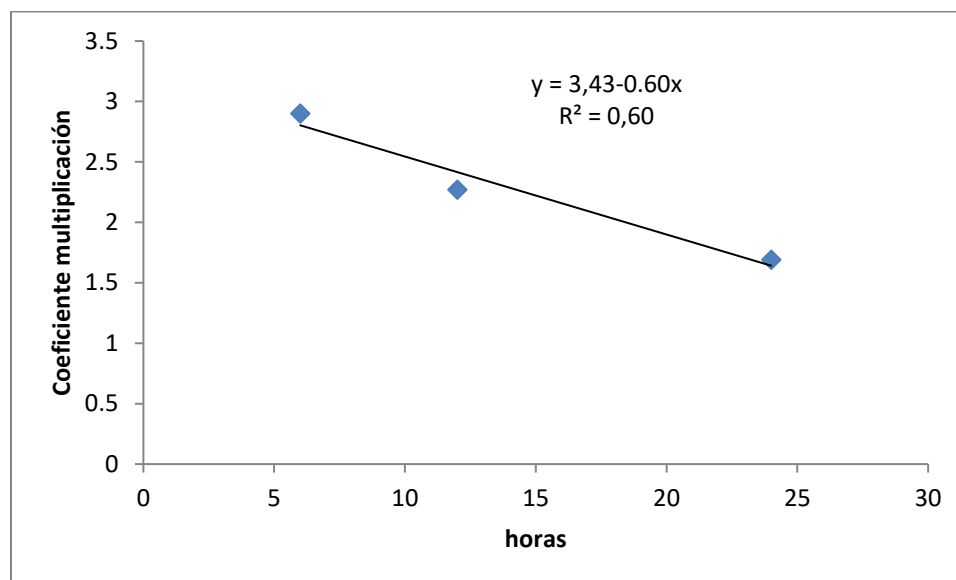


Figura 7. Coeficiente de multiplicación en jengibre, *Zingiber officinale*, variedad gran caimán en el estudio de frecuencia de inmersión cuatro semanas después de la siembra. Santa Clara, San Carlos.

La evaluación del coeficiente de multiplicación de jengibre como respuesta a diferentes frecuencias de inmersión, cuatro semanas después de la siembra, mostró diferencias significativas. La frecuencia de inmersión efectuada cada seis horas, permitió el desarrollo de 2,9 brotes. Con la inmersión de cada 12 horas, se obtuvieron 2,3 brotes por explante y finalmente, el tratamiento de inmersión de cada 24 horas, permitió una menor respuesta, cuantificándose 1,71 brotes por explante. Esta respuesta de formación de brotes en relación con la frecuencia de inmersión, se ajustó a una ecuación de regresión lineal decreciente, de tal manera que el coeficiente de multiplicación aumentó al disminuir la frecuencia de inmersión con un $R^2 = 0,60$ (Figura 7).

La frecuencia de inmersión influye según el estado de desarrollo del material vegetal cultivado en la renovación de la atmósfera interna del recipiente de cultivo, así como en la asimilación del material vegetal de los nutrientes del medio de cultivo, McAlister et al., (2005) y Mehrotra et al., (2007). 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 del material vegetal. (Escalona, 2006), o los cultivos que se están considerando micropropagar, tal es el caso del ñame, *Dioscoria alata* en donde las frecuencias de inmersión de cada 12 y 24 horas, mostraron menos posibilidades para asimilar nutrientes y acumular sustancias de reservas; comparados con el

tratamiento de cuatro inmersiones al día con el que los micro tubérculos alcanzaron los mayores porcentajes de materia seca (Cabrera et al. 2009).

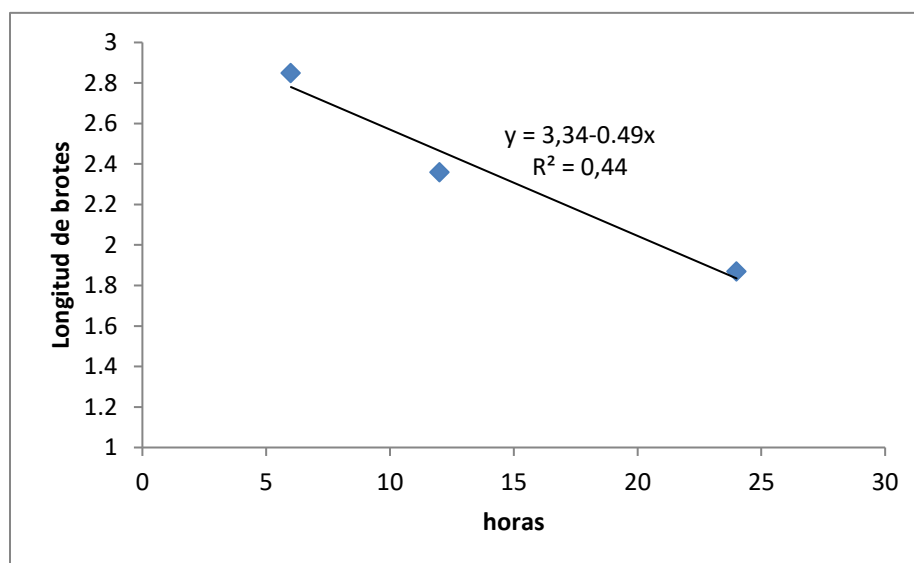


Figura 8. Longitud de brotes en jengibre, *Zingiber officinale*, variedad gran caimán en el estudio de frecuencia de inmersión cuatro semanas después de la siembra. Santa Clara, San Carlos.

La frecuencia de inmersión del medio de cultivo tuvo influencia sobre la longitud de los brotes de jengibre evaluado a las cuatro semanas, de tal manera que los mayores valores (2,85 cm) se obtuvieron cuando la inmersión se realizó cada seis horas. Los valores fueron disminuyendo con frecuencias de 24 horas (1,87 cm). La tendencia de esta respuesta se ajustó a una ecuación de regresión que se muestra en la figura 8.

La respuesta del número de raíces en brotes de jengibre, sometidos a diferentes frecuencias de inmersión, se ajustó a una ecuación de regresión lineal decreciente; de tal manera que al aumentar la frecuencia de inmersión se disminuyó el número de raíces. El mayor número de raíces se cuantificó cuando la frecuencia de inmersión fue de seis horas y el menor número de raíces se obtuvo cuando los brotes estuvieron sometidos a una frecuencia de inmersión cada 24 horas (Figura 9).

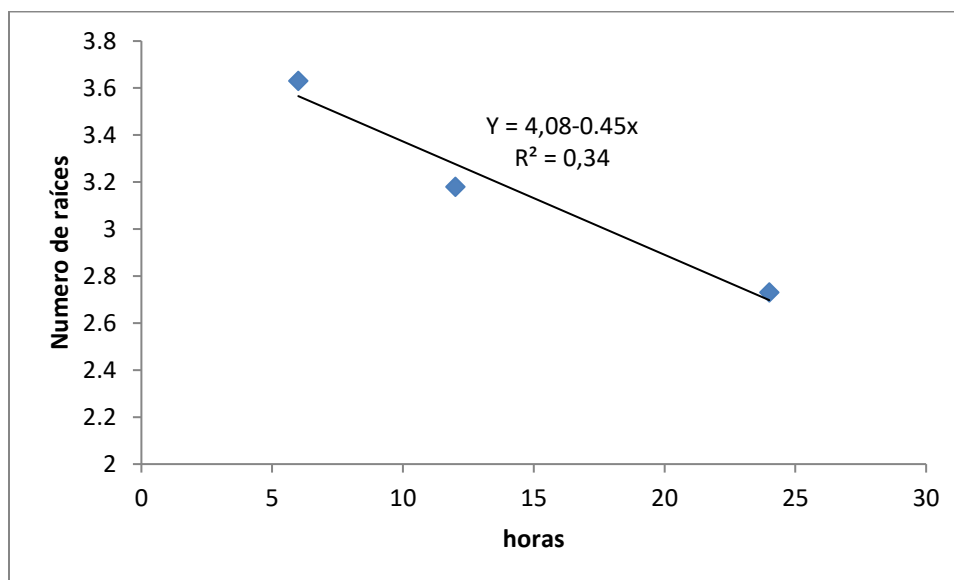


Figura 9. Número de raíces de brotes en jengibre, *Zingiber officinale*, variedad gran caimán en el estudio de frecuencia de inmersión 4 semanas después de la siembra. Santa Clara, San Carlos.

En los sistemas BIT, los explantes no están constantemente en contacto con el medio de cultivo, ya que se regula la frecuencia de tal manera que la poca permanencia de contacto del líquido con el explante permite la renovación constante de la atmósfera interna de los frascos. Este hecho evita la acumulación de gases nocivos como el etileno, facilita la regulación de la concentración de CO₂ y además, mejora la oxigenación de los tejidos. Los explantes retienen una película del medio de cultivo que evita la desecación e incrementa la disponibilidad y asimilación de los nutrientes, lo cual se traduce en un crecimiento vigoroso y mejor desarrollo. Además, estos aspectos positivos del BIT, favorecen la fotosíntesis de las plantas (Tiesson y Alvard, 1997).

5.3. Estudio del volumen de medio utilizado en BIT con explantes de jengibre *Zingiber officinale* R.

Las variables evaluadas como respuesta a tres volúmenes de medio de cultivo durante cuatro semanas se ordenaron en los cuadros 13 A, 14 A, 15 A, 16 A, 17 A y 18 A.

Una semana después de la siembra se evaluó la longitud de explante y el coeficiente de multiplicación como respuesta al volumen utilizado en biorreactor de inmersión temporal sin encontrar diferencias estadísticas. Dos semanas después de la siembra del ensayo se evaluaron las siguientes variables: longitud de los brotes, longitud del explante y el coeficiente de multiplicación, en donde tampoco se encontró diferencias estadísticas.

En esta tercera semana, aún no se obtuvo diferencias significativas en ninguna de las variables evaluadas. Sin embargo, al igual que los experimentos anteriores, es a partir de la semana tres cuando se encontraron diferencias estadísticas significativas.

En la cuarta y última semana de evaluación del volumen de medio, se cuantificaron todas las variables, incluyendo además; relación peso fresco aéreo/peso fresco de la raíces e incremento de peso fresco total de la parte aérea y raíz.

Bertholy 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 micropropagación de jengibre.

Es importante notar que en la medida en que se incrementó el volumen de medio de cultivo, aumentó el coeficiente de multiplicación, tal y como se aprecia en el Cuadro 18 A. Se obtuvo diferencias altamente significativas en las variables longitud de brotes y coeficiente de multiplicación.

Para lograr un mismo desarrollo en la técnica de cultivo de tejidos, es necesario proveer a las plantas con suficientes cantidades de nutrientes esenciales, de tal manera que los nutrimentos no sean un factor limitante para la multiplicación en el desarrollo de las plantas. El medio líquido en inmersión temporal, provee a las plantas *in vitro* de suficiente y oportuna cantidad de nutrimentos

si se compara con los medios gelificados. Se ha determinado que las tasas más altas de multiplicación con meristemas de banano, se lograron en sistemas BIT, obteniéndose coeficientes de multiplicación mayores a 5, mientras que con los métodos convencionales gelificados con agar, las tasas de multiplicación van de 2,2 hasta 3,1 (Colmenares y Giménez, 2003). La tasa de multiplicación en medios líquidos en BIT también fue mayor cuando se micropropagó la caña de azúcar (23,9) comparados con las tasas de multiplicación obtenidos con un medio convencional gelificados (3,96) cuantificado a los 30 días después de la siembra (Berthouly y Etienne, 2005, p. 174).

En el presente estudio, en el tratamiento de 20 mL de medio de cultivo por explante, se observaron plántulas de jengibre cloróticas, situación que no se manifestó en los tratamientos de 40 mL de medio/explante y el tratamiento de 60 mL/explante. Por esta razón, se seleccionó como mejor tratamiento a 40 mL de medio/explante.

Al evaluar el volumen de medio, se comprende que existe gran relación entre la cantidad de explantes que se utilizan por unidad experimental con respecto al volumen de medio utilizado y el tiempo de subcultivo (Berthouly y Etienne, 2005, p 174)

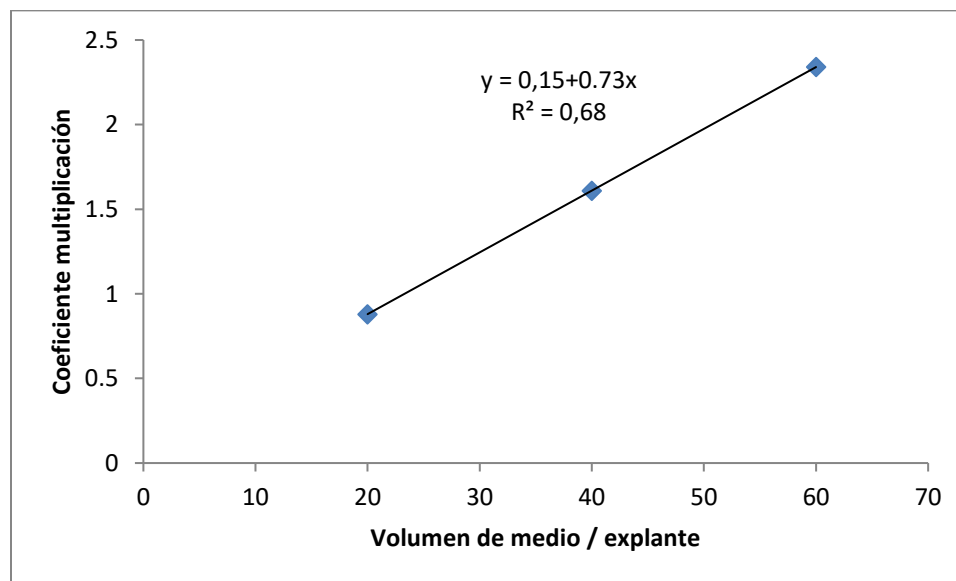


Figura 10. Coeficiente de multiplicación en jengibre, *Zingiber officinale*, variedad gran caimán en el estudio de volumen de medio en BIT cuatro semanas después de la siembra. Santa Clara, San Carlos.

El coeficiente de multiplicación evaluado como respuesta al medio de cultivo se ajustó a una recta de regresión lineal (Figura 10). El coeficiente de multiplicación al ser esta variable una de las más importantes se aplicó la prueba Duncan a los promedios del número de brotes de jengibre como respuesta a volumen de medio de cultivo, utilizando un biorreactor de inmersión temporal, a las cuatro semanas después de la siembra: no se observó diferencia estadística cuando se evaluaron los volúmenes de 40 y 60 mL de medio de cultivo (Cuadro 2). Se ha demostrado que altos volúmenes de medio de cultivo líquido son menos eficientes y Lorenzo et al. (1998) p 199, indican que esta respuesta pueda darse por la secreción de moléculas químicas que estimulan la formación de brotes, estos productos químicos se diluyen cuando se usan grandes volúmenes de medio.

Cuadro 2. Promedio del número de brotes, en el estudio del volumen de medio utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán, Santa Clara, San Carlos, durante la semanas 4 de evaluación.

Volumen de medio (ml) por explante	Promedio del número de brotes	D/1
60	2,775	a
40	2,700	a
20	1,320	b

Prueba Duncan en donde las medias con la misma letra no difieren estadísticamente ($P \leq 0,05$).

El volumen de medio de cultivo por explante dispensado en los BIT, representa uno de los factores que se deben evaluar, si se quiere que estos sistemas de cultivo funcionen eficientemente (Berthouly y Etienne, 2005). Esto se observa en esta investigación, en donde el volumen de medio de cultivo por explante que se seleccionó como el más apropiado, fue el de 40 mL/explante (Cuadro 2).

En estudios realizados por Berthouly y Etienne (2005) para determinar el mejor volumen de medio de cultivo se presentaron los mejores resultados de multiplicación de yemas axilares de ñame, cuando el frasco contiene volúmenes de medio de cultivo de 40 y 50 mL, comparados con el volumen de medio de 20 y 30 mL.

5.4. Estudio de comparación de los tratamientos BIT vs medio semisólido en la micropropagación de jengibre *Zingiber officinale* R, mediante prueba de contraste de “T de student”

5.4.1. Número de brotes, longitud de explante una semana después del establecimiento del ensayo.

La prueba de contraste de medias (T de student) mostró diferencias estadísticas significativas cuando se comparó el medio BIT versus el medio semisólido en la micropropagación de *Zingiber officinale*, una semana después de establecido el estudio para las variables número de brotes y longitud del explante.

La media del número de brotes del tratamiento BIT superó cuatro veces la media del tratamiento del número de brotes de *Z. officinale*, en comparación de los brotes que crecieron en el medio de cultivo semisólido. La longitud del explante fue superior cuando creció en los biorreactores de inmersión temporal superando el 100 % a los explantes que crecieron en el medio semisólido (Cuadro 19 A).

5.4.2. Número de brotes longitud de explante, 2 semanas después de iniciado el ensayo.

La segunda evaluación, cuantificada dos semanas después de iniciado el ensayo, mostró diferencias significativas para las dos variables evaluadas: número de brotes y longitud del explante. La respuesta del número de brotes fue cuatro veces superior cuando crecieron en los biorreactores de inmersión temporal (Cuadro 20 A).

5.4.3. Número de brote, ancho de lámina foliar, longitud de raíces, longitud de explante 3 semanas después de iniciado el ensayo.

La prueba de contraste de medias (T de student) mostró diferencias estadísticas cuando se comparó el medio BIT versus el medio semisólido en la micropropagación de jengibre tres semanas después de establecido el estudio para las variables, número de brotes, número y longitud de raíces y longitud del explante. Estas variables fueron superiores cuando crecieron en los biorreactores de inmersión temporal. La media de la variable número de brotes cuantificados en los biorreactores, fue superior en comparación con las que crecieron en el medio de cultivo semisólido (Cuadro 21 A). Resultados similares obtuvieron Albany et al; (2015) cuando compararon el medio de cultivo

líquido con el medio solidificado en las diferentes etapas de micropropagación de sábila, *Aloe vera*, y obtuvieron un mayor porcentaje de explantes establecidos en el medio de cultivo líquido, comparado con el medio de cultivo solidificado con agar.

Según Lorenzo et al. (1998) Estos resultados se relacionan con la facilidad que tienen los explantes de absorber los nutrientes de los medios líquidos y en los que manifiestan mayor crecimiento en un corto tiempo, mientras que los medios de cultivo solidificados, limitan 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 su crecimiento.

5.4.4. Número de brotes, longitud de brotes, número de hojas, longitud de lámina foliar, ancho de lámina foliar, número de raíces, longitud de raíces y del explante, relación parte aérea/raíz y diferencia de peso.

La prueba de contraste de media de (T de student) mostró diferencias significativas, cuando se comparó el sistema BIT contra el medio semi-sólido, en la micropropagación de jengibre, variedad gran caimán en las variables número de brotes, longitud de raíces, relación parte aérea/raíz; cuatro semanas después de iniciado el estudio.

El medio líquido de los BIT permitió una mayor concentración de biomasa en la parte aérea, superando tres veces el obtenido en los medios semi-sólidos. Estos resultados son favorables para los medios líquidos por cuanto lo que se busca en estas etapas, es mayor concentración de brotes, que se respalda por una mayor concentración de biomasa obtenida en los BIT (Cuadro 22 A).

Las variables, número de brotes y parte aérea/raíz fueron superiores con el tratamiento de biorreactor de inmersión temporal (Figura 11 y 12). Se duplicó el número de brotes de jengibre cuando crecieron en el medio líquido del BIT (4.40), se comparó con el número de brotes que se desarrollaron en el medio semi-sólido (1.90). La variable relación parte aérea raíz fue superior en el medio líquido con 9,14 gramos, mientras que en el medio semisólido se cuantificaron 3,46 gramos (Cuadro 22 A). Estos resultados en BIT son debido a que la biomasa se distribuyó eficientemente en la mayor cantidad de brotes que superaron al medio semisólido. Así se establece la evidencia del escalamiento en la micropropagación de jengibre, mediante el medio líquido de BIT, comparado con el protocolo de micropropagación de jengibre como método convencional publicado por Palma y Matarrita (1992).

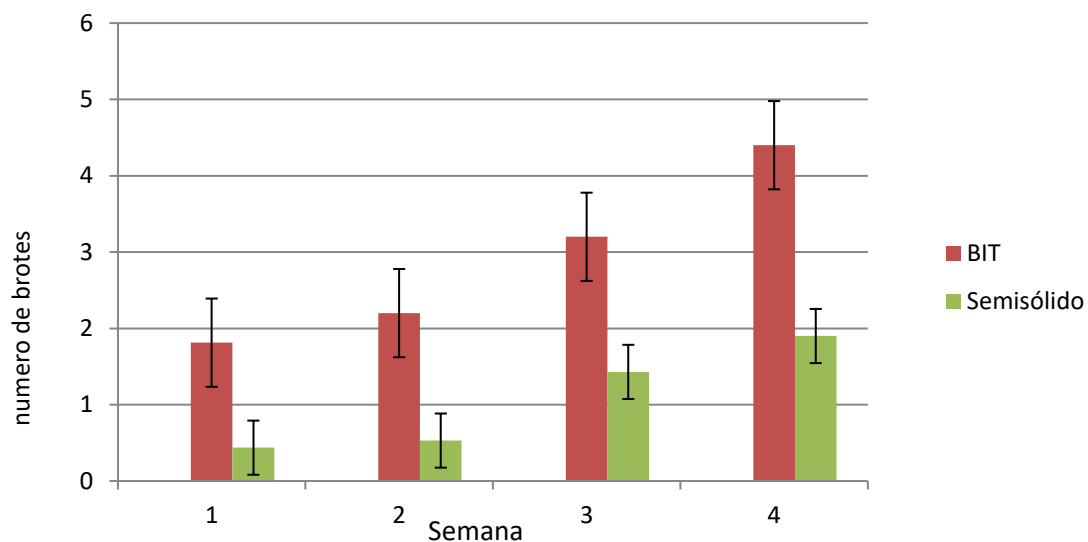


Figura 11. Número de brotes de jengibre, (*Zingiber officinale*) variedad gran caimán como respuesta a un medio líquido, BIT y a un medio semisólido, evaluado durante cuatro semanas.

La mayor cantidad de brotes obtenidos en el medio de inmersión temporal está determinada por la facilidad que tienen los explantes de asimilar rápidamente los nutrientes en el medio líquido, lo que genera una mayor respuesta en un corto tiempo. Contrario a lo expuesto, los medios 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 solidificado dificulta la rapidez y como consecuencia el crecimiento es menor cuando se compara con los medios líquidos (Lorenzo et al., 1998).

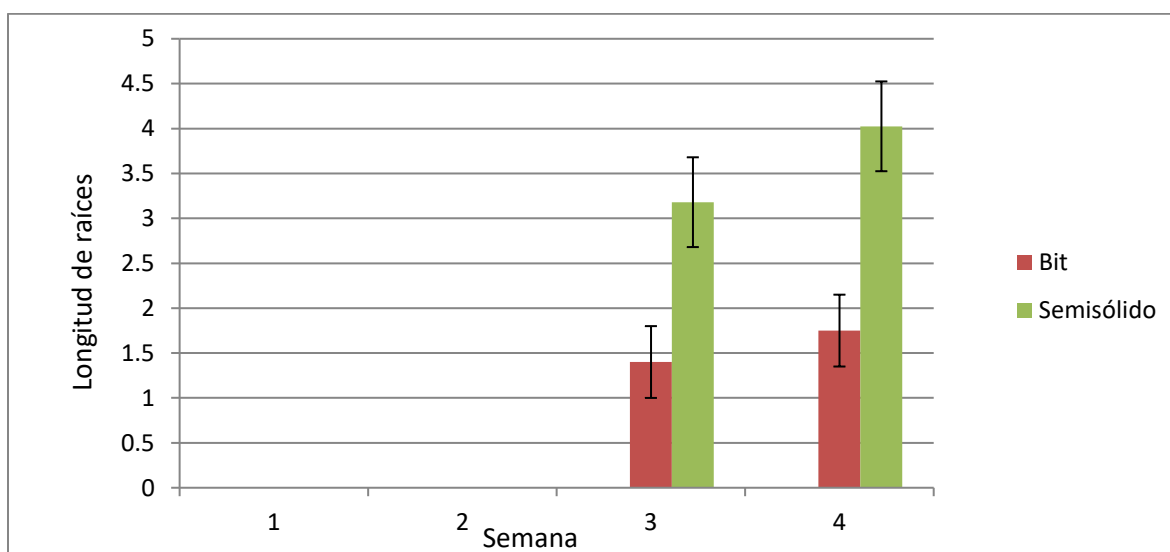


Figura 12. Número de raíces en brotes de jengibre, (*Zingiber officinale*) variedad gran Caimán como respuesta a un medio líquido en BIT y a un medio semisólido, evaluado durante cuatro semanas.

En relación con la variable longitud de raíces, se observó una mejor respuesta cuando las plántulas de jengibre crecieron en un medio semi-sólido, con un valor de 4.0 cm de longitud, comparado con los brotes que crecieron en los biorreactores de inmersión temporal, con una longitud de 1.7 cm.

La variable número de raíces y longitud de raíces, solo mostró diferencias estadísticas con la longitud de raíces. La mayor longitud de raíces se observó en los brotes que crecieron en el medio solidificado con agar, superando cuatro veces el obtenido en los medios BIT. 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*. De tal manera que una proporción de auxina/citocinina a favor de la citocinina aumenta el coeficiente de multiplicación de brotes como es de esperar en este ensayo, con un medio de cultivo que contiene las sales MS y suplementado con 3 mg/L bencil adenina (citocinina) y 1 mg/L ácido naftalenacético (auxina). La formación de raíces en un brote se ve favorecida cuando la disponibilidad de nutrimentos por difusión es lenta tal y como se observó en el presente estudio, cuando los brotes crecieron en medios semisólidos.

La formación y desarrollo de raíces se ve estimulado también en uchuva o uvilla, *Physalis peruviana* cuando se siembran sus brotes en un medio de cultivo al 50 % de concentración de sales, en este medio el crecimiento de raíces fue de 6 cm mientras que los brotes de la misma planta sembrada en un medio MS completo no permitió el desarrollo de raíces cuando la evaluación se realizó 15 días después de la siembra (Martínez et al., 2011)

Lo anterior coincide con lo indicado por Hyndman et al. (1982), quienes señalan que cuando se reducen las sales al 50 % de su concentración, se logra un mayor tamaño de raíces. Estos resultados se relacionan con la facilidad que tienen los explantes de absorber los nutrientes de los medios líquidos, manifestando mucho crecimiento en un corto tiempo. Contrario a lo expuesto, los medios de cultivo solidificados limitan 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 (Lorenzo et al., 1998).

Los medios líquidos permiten una mayor absorción de nutrientes por parte de los explantes cuando se comparan con los medios semisólidos, ya que los nutrientes forman parte de los soportes gelificantes, disminuyendo la velocidad de difusión de dichos nutrientes. Esta dificultad de absorber los nutrientes por parte de los brotes, los obliga a formar mayor cantidad de raíces en comparación con los medios líquidos en los que dispone constantemente de nutrientes (Lorenzo, *et al.* 1998).

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

6. CONCLUSIONES

Con base en las condiciones experimentales en que se llevó a cabo el presente estudio, se concluye:

- a) Las variables morfológicas evaluadas como respuesta al tiempo de inmersión no mostraron diferencias estadísticamente.
- b) El tiempo de evaluación de cinco minutos se seleccionó como el mejor tiempo de inmersión, considerando que prolongados tiempos de exposición aumentan las posibilidades de obtener respuestas de vitrificación, disminuyendo la eficiencia del sistema.
- c) Las variables longitud de brotes, número de raíces, coeficiente de multiplicación resultaron con diferencias significativas al ser evaluadas como respuesta a la frecuencia de inmersión. La frecuencia de inmersión de 6 horas permitió la mayor mutliplicación de brotes de jengibre con diferencias significativas.
- d) Las variables, número de hojas, longitud de lámina foliar, ancho de lámina foliar, longitud de raíces, longitud de explante, relación peso fresco parte aérea parte radical e incremento de peso fresco de jengibre, no mostraron diferencias significativas al evaluarse su respuesta a la frecuencia de inmersión.
- e) Las variables longitud de brotes, y coeficientes de multiplicación resultaron estadísticamente diferentes cuando se evaluó el volumen de medio de cultivo. La prueba Duncan permitió seleccionar a 40 mL de medio como el más apropiado para micropropagación mediante BIT.
- f) Las variables número de hojas, ancho de lámina foliar, número de raíces, longitud de raíces, longitud del explante, y la relación parte aérea raíz no mostraron diferencias estadísticas al evaluarse su respuesta al volumen de medio de cultivo.
- g) El número de brotes de jengibre se duplicó cuando crecieron en BIT (4,4) en comparación con el número de brotes que se desarrollaron en el medio semisólido (1,9).
- h) La variable relación parte aérea/raíz fue superior en el medio líquido con 9,14 gramos, mientras que en el medio semisólido se cuantificaron 3,46 gramos.

- i) Los BIT son una forma eficiente de multiplicación de jengibre superando los métodos convencionales de micropropagación utilizando medios de cultivo solidificados.

7. RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio se plantean las siguientes recomendaciones:

- a) Evaluar el porcentaje de sobrevivencia de las plantas obtenidas en BIT cuando se someten a la etapa de aclimatación o endurecimiento.
- b) Aumentar los periodos de inmersión, considerando tiempos superiores a los 15 minutos, para valorar el efecto sobre la vitrificación de las plántulas de jengibre obtenidas en los BIT.
- c) Evaluar el número de explantes como unidad experimental, considerando valores de más de 10 explantes por frasco BIT.
- d) Determinar los cambios de pH y análisis de sales en los medios de cultivo de los BIT al inicio y al final de los estudios, con el fin de determinar la disponibilidad de los micronutrientes por parte de las plántulas de jengibre.
- e) Incrementar el periodo de evaluación de las respuestas de jengibre en los BIT, en tiempos superiores a cuatro semanas y hasta doce semanas, para evaluar principalmente el coeficiente de multiplicación.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackermann, D., Bruschi, A., Sonntag, K., y Sellner, M. (2003). *Using the temporary immersion technique for in vitro culturing of renewable resources plants*. 46-49 In: *Agricultural techniques and technologies on the light agenda*.
- Akimoto, M., Iizuka, M., Kanematsu, R., Yoshida, M., & Takenaga, K. (2015). *Anticancer Effect of Ginger Extract against Pancreatic Cancer Cells Mainly through Reactive Oxygen Species-Mediated Autotic Cell Death*. PLoS One.; 10(5). Recuperado de: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0126605>
- Albany, N. R., Vilchez S., León, A., Nava, L. J., Martínez, M. A., Molina. (2015). *Medios de cultivo líquidos: un avance para la micropropagación comercial de zábila (Aloe barbadensis Mill)*. Revista Colombiana Biotecnología. Vol 17; N° 1.
- Alvarado, L. (2016). Análisis de mercado, jengibre. *Temas de información agroalimentario. Boletín Informativo 01*. Consejo Nacional de Producción. p 5.
- Alvarado, L. (2016). Análisis de mercado, jengibre. *Temas de información agroalimentario. Boletín Informativo 02. Consejo Nacional de Producción*. p 5.
- Alvard, D., Cote, F., y Teisson, C. (1993). Comparación de los métodos de cultivo medio líquido para la micropropagación de plátano. *Célula de planta, cultivo de tejidos y de órganos*, 32 (1), 55-60.
- Basail, M. P., Medero, V. E., Otero, G. M., Torres, D. J., López, T. M., Cabrera J. S., Pino, A., Rayas, C. M., Bauta, T., y Beovidez, G. (2012). *Empleo de Sistemas de Inmersión*

- Temporal como alternativa para la multiplicación in vitro del cultivar de plátano vianda 'INIVITPV06-30' (Musa AAB)* A. Biotecnología Vegetal .12 (1): 53 – 57.
- Bhatia S., K. Sharma. (2015). Technical glitches in micropropagación, in Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences. pp 393-404.
- Berthouly, M., Etienne, H. (2005). *Temporary immersion systems: a new concept for use liquid medium in mass propagation*. En: Hvoslef-Eide A. K. y Preil W. (Ed). Liquid Culture Systems or *in vitro* Plant Propagation, pp. 165-195.
- Bhojwani, SS, y Dantu, PK (2013). *Totipotencia celular. En cultivo de tejidos vegetales: un texto de introducción* (pp 63-74.). Springer India.
- Cabrera, M. A., Gomez, R., & Feria, M. D. (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 de Santa Clara, Instituto de Biotecnología de las plantas. Cuba.
- Castro, D. y González, J. (2002). *Eucaliptus (Eucalyptus grandis Hill ex Maiden) micropropagation Sin a temporary immersion sistema. Agricultura sostenible, 62(1):68-78*
- Colmenares, M., & Giménez, C. (2003). Multiplicación in vitro Musa spp. mediante sistema de inmersión temporal. Revista de la Facultad de Agronomía, Venezuela, 20(4), pp 468-477.
- Cruzat, G. R. (2009). Resultados y lecciones en sistema de inmersión temporal en especies anuales, frutales y vides. *Proyecto de Innovación en las Regiones Metropolitana, del Maule, del Biobío y de Los Ríos. Chile. Ograma Ltda, 37-46.*

Dake, G. N. (1995). Diseases of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) and their management. *Journal of Spices & Aromatic Crops*. 4(1):40-48,.

De exportadores Costarricenses IICA. (2003). *Estudios técnicos para la elaboración de propuestas de negociación: tratado de libre Comercio entre los Estados Unidos y Centroamérica*. (No 382.97286073 C172e). [San José], CR: Cámara de Exportadores Costarricenses. Subsector jengibre. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura-San José, CR: CADEXCO. p 125.

Debergh P, Harbaoui Y & Lemeur R (1981). Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*) / evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physiol. Plant*. 53: 181–187

Escalona, M. (2006). *Temporary immersion beats traditional techniques on all fronts*. *Prophyta anual*. pp. 48-50.

Escalona, M., Cid, M., Lezcano, Y., Capote, I., Yáñez, E., González, J. (1999). *Propagación de la piña (Ananas comosus (L.) Merr.) En biorreactores de inmersión temporal*. Efecto de la frecuencia de inmersión y el paclobutrazol. BioVeg'99. Ciego de Avila, Cuba. Libro de resúmenes, p. 28

Etienne, H., Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant cell Tissue Organ Culture*. 69 (3):215-231.

Fernández, O. M. y Quesada, A. S. (2009). *Nemátodos asociados a los cultivos de Costa Rica*. MAG. San José, Costa Rica. pp 1-49

- Hernández A., Gatica, A., y Alvarenga, V. (2008). Vaso fermentador de bajo costo para la micropropagación masiva de jengibre. *Agronomía Mesoamericana*.19 (1):87-92
- Etienne, H., Dechamp, E., Etienne, D., Bertrand, B. (2006). *Bioreactors in coffee micropropagation* Braz. J. Plant Physiol. vol.18 no.1
- Hyndman, E., S., Hasegawa, P., M., Bressan, A., R. (1982). *Stimulation of root initiation from cultured rose shorts through the use of reduced concentrations of mineral salts.* Horticultural Science. 17:82-83
- Krueger, S; C. Robacker, W.,Simonton. (1991). *Culture of Amelanchier x grandiflora in a programable micropropagation apparatus.* Plant Cell and Organ Culture. 27:219-226
- Lorenzo, J.C., González, B, L., Escalona, M., Teisson, Cl. P., Espinoza, C., Borroto. (1998). Sugarcane shoot formation in an improved temporary inmersión system. *Plant Cell and organ culture.* 54: 197-200
- Martínez, M., Pastelín, M., Ventura, E., Castañeda, O., González, T., Guevara, M., Luna, A., Díaz C. (2011). *Alargamiento y enraizamiento de vitro plantas de cereza del Perú (Physalis peruiviana L.)* Tropical and subtropical agroecosystems. Universidad de vera cruz. Facultad de ciencias químicas. Vol 3. Núm 3. Mérida, Yucatán México 537-542 pp
- 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.
- McAlister, B., Finnie, J., Watt, M., Blakeway, F. (2005). *Use of the temporaty immersion vioreactor system (RITA) for production of commercial Eucalyptus clones in Mondi*

- Forests* (SA). A.K. Hvoslef-eide and W. Preil (eds.). *Liquid Culture Systems for in vitro plant Propagation*, pp 425-442.
- Mehrotra, S., Manoj, G., Arun, K., Bhartendu, M. (2007). *Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization*. *African Journal of Biotechnology*. 6 (13): 1484-1492
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (1994). *Análisis de la problemática tecnológica, plagas y enfermedades*. Santa Rosa, Pocosol. Alajuela. Recuperado de: [www. mag.go.cr](http://www.mag.go.cr).
- Morales, A. M. (2007). *El Cultivo del Jengibre, Zingiber officinale*. San Jose: Ministerio de Agricultura y Ganadería, Costa Rica. 1-13
- Muñoz, M. (2006). *Tesis, Estudio de Sistema de cultivo in vitro, aclimatación de plantulas y crecimiento de bulbos en tres especies de Rhodophiala Presl. (Amaryllidaceae)*. Univerdad Austral de Chile. 117 pp
- Murashige, T. F., y Skoog, A. (1962). *Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture*. *Physiologia Plantarum*, 15. 476-498. p 478
- Palma T. y Matarrita G., (1992). *Propagación clonal de jengibre (Zingiber officinale. Roscoe) in vitro*. *Tecnología en Marcha*. v. 11, no. 3 p. 43-50. p 42
- Park, E. J. y Pezzuto J. M. (2002). *Botanicals in cancer chemoprevention*. *Cancer Metastasis Rev*; 21: 231–255.
- Pérez, N. M., deFeria, E., Jiménez, A., Capote, M., Chávez, E., y Quiala. (2001). *Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal para la producción a gran escala de tubérculos in vitro*

- de Solanum tuberosum L. var. Atlantic y estudio de su comportamiento en el campo.* Biotecnología vegetal 1: p 17-21.
- Preil, W. (2005). *General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for in vitro culture.* In *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation.* (pp 1-18) Springer Netherlands.
- Ramteke, P. y Kamble, S. (2010). *La sensibilidad de Fusarium solani hacia benomil.* BIOINFOLET-A Quarterly Journal of Life Sciences , 7 (3), 233-234.
- Roels, S., Escalona, M., Cejas, I., Noceda, C., Rodriguez, R., Canal, M. J. & Debergh, P. (2005). *Optimization of plantain (Musa AAB) micropropagation by temporary immersion system.* Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 82(1), 57-66.
- Sharma, T. R., & Singh, B. M. (1997). *High-frequency in vitro multiplication of disease-free Zingiber officinale Rosc.* Plant Cell Reports, 17(1), 68-72.
- Skoog, F. and Miller, C.O. (1957). *Chemical Regulation of Growth and Organ Formation in Plant Tissue Cultured in Vitro.* Symposia of the Society for Experimental Biology, 11, 118-131.
- Srivastava, KC, y Mustafa, T. (1992). *El jengibre (Zingiber officinale) en los trastornos músculo-esqueléticos y reumatismo.* Hipótesis médicas, 39 (4), 342-348.
- Stanly A., Bhatt A., Ali D., Keng L and Peng L. (2011). *Evaluation of free radical scavenging activity and total phenolic content in the petiole-derived callus cultures of Zingiber zerumbet Smith.* Academic Journals Full Length Research Paper. Vol. 5(11), pp. 2210-2217 Available online at <http://www.academicjournals.org/JMPR> ISSN 1996-0875

- Teisson, C., & Alvard, D. (1997). RITA an apparatus for application of temporary immersions in plant tissues culture. Resúmenes: Técnicas avanzadas a la propagación masiva de plantas. BIOVEG, 97, 32.
- Watt M. P. (2012). The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(76), pp. 14025-14035
- Zick, S. M., Turgeon, D. K., Ren, J., Ruffin, M. T., Wright, B. D., Sen, A., y Brenner, D. E. (2015). *Estudio clínico piloto de los efectos del extracto de raíz de jengibre en eicosanoides en la mucosa colónica de sujetos con mayor riesgo de cáncer colorrectal. Carcinogénesis Molecular*, 54 (9), 908-915.
- Ziv, M. (2002). *Simple bioreactors for mass propagation of plants*. En: 1st Int. Symp. «Liquid Systems for *in vitro*. Mass Propagation of Plants. As, Norway. pp 13-14.
- Ziv, M., (1995). *The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. Acta Horticulturae*, 393 pp: 25-38.

9. ANEXOS

Cuadro 1 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia, para la longitud del explante y el coeficiente de multiplicación en el estudio del tiempo de inmersión; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos. Evaluados una semana después de la siembra.

Fuente de variación	Longitud Explante	Coeficiente multiplicación
Trat	0.025 ^{ns}	3.54 ^{ns}
Error	0.014	1.15
Gl error	6	6
Gl trat	2	2
C.V	26.00	23.28

ns = diferencia no significativa

Cuadro 2 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud de brotes, longitud del explante, coeficiente de multiplicación, en el estudio del tiempo de inmersión; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados dos semanas después de la siembra.

Fuente de variación	Longitud Brotes	Longitud Explante	Coeficiente multiplicación
Trat	0.18 ^{ns}	1.02 ^{ns}	0.02 ^{ns}
Error	0.40	1.23	0.09
Gl error	6	6	6
Gl trat	2	2	2
C.V	27.07	22.90	37.37

ns=diferencia no significativa

Cuadro 3 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud de brotes, número de hojas, longitud de lámina foliar y ancho de lámina foliar, en el estudio del tiempo de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados tres semanas después de la siembra.

Fuente de variación	Longitud brotes	Número hojas	Longitud lámina foliar	Ancho lámina foliar
Trat	0.003 ^{ns}	0.006 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.003 ^{ns}
Error	0.20	0.004	0.10	0.04
Gl error	6	6	6	6
Gl trat	2	2	2	2
C.V	18.20	3.01	20.77	26.45

ns=diferencia no significativa

Cuadro 4 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para el número de raíces, longitud de explante y coeficiente de multiplicación, en el estudio del tiempo de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados tres semanas después de la siembra.

Fuente de variación	Número raíces	Longitud Raíces	Longitud Explante	Coficiente multiplicación
Trat	3.06 ^{ns}	0.40 ^{ns}	3.90 ^{ns}	2.96 ^{ns}
Error	2.74	0.09	3.06	1.26
Gl error	6	6	6	6
Gl trat	2	2	2	2
C.V	35.35	8.96	30.14	52.20

ns=diferencia no significativa

Cuadro 5 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud de brotes, número de hojas, longitud de lámina foliar, ancho de lámina foliar y número de raíces, en el estudio del tiempo de inmersión; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados cuatro semanas después de la siembra.

Fuente de variación	Longitud brotes	Número hojas	Longitud lámina foliar	Ancho lámina foliar	Número raíces
Trat	2.51 ^{ns}	0.03 ^{ns}	0.24 ^{ns}	0.003 ^{ns}	0.68 ^{ns}
Error	1.02	0.03	0.09	0.17	0.15
Gl trat	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Gl error	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
C.V	31.41	7.87	13.35	34.83	8.54

ns= diferencias no significativas

Cuadro 6 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud de la raíz, longitud de explante, relación peso fresco parte aérea parte radical, incremento de peso fresco y coeficiente de multiplicación, en el estudio del tiempo de inmersión; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados cuatro semanas después de la siembra.

Fuente de variación	Longitud raíces	Longitud Explante	Relación parte aérea /raíz	Incremento Peso fresco	Coficiente multiplicación
Trat	0.43 ^{ns}	1.19 ^{ns}	7.41 ^{ns}	0.23 ^{ns}	0.44 ^{ns}
Error	0.32	1.61	2.15	0.08	0.29
Gl trat	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Gl error	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
C.V	15.67	25.37	35.03	19.74	14.51

ns= Diferencias no significativas

Cuadro 7 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud del explante y coeficiente de multiplicación, en el estudio de la frecuencia de inmersión; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados una semana después de la siembra.

Fuente de variación	Long. Explante	Coficiente multiplicación
Trat	0.24 ^{ns}	0.20 ^{ns}
Error	0.25	0.11
Gl error	6	6
Gl trat	2	2
C.V	11.6	45.7

ns= diferencia no significativa

Cuadro 8 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud de brotes, longitud del explante, coeficiente de multiplicación, en el estudio de la frecuencia de inmersión; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados dos semanas después de la siembra.

Fuente de variación	Longitud brotes	Longitud Explante	Coficiente multiplicación
Trat	0.23 ^{ns}	0.73 **	0.14 ^{ns}
Error	0.24	0.02	0.20
Gl error	6	6	6
Gl trat	2	2	2
C.V	18.71	3.53	30.34

**Altamente significativo

Cuadro 9 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud de brotes, número de hojas, longitud de lámina foliar y ancho de lámina foliar en el estudio de la frecuencia de inmersión; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados tres semanas después de la siembra.

Fuente de variación	Longitud brotes	Número hojas	Longitud lámina foliar	Ancho lámina foliar
Trat	0.23 ^{ns}	0.08 ^{ns}	0.15 *	1.73 ^{ns}
Error	0.14	0.42	0.03	1.58
Gl error	6	6	6	6
Gl trat	2	2	2	2
C.V	15.51	24.99	8.07	105.47

ns:diferencia no significativa, *diferencias significativas

Cuadro 10 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para el número de raíces, longitud de raíces, longitud de explante y coeficiente de multiplicación, en el estudio de la frecuencia de inmersión; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados tres semanas después de la siembra.

Fuente de variación	Número raíces	Longitud raíces	Longitud Explante	Coficiente multiplicación
Trat	1.29 **	0.91 ^{ns}	0.83 *	0.67 ^{ns}
Error	0.13	1.82	0.16	0.30
Gl error	6	6	6	6
Gl trat	2	2	2	2
C.V	12.70	37.42	8.77	30.49

ns: diferencia no significativa, *diferencias significativas, **diferencias altamente significativas

Cuadro 11 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud de brotes, número de hojas, longitud de lámina foliar, ancho de lámina foliar y número de raíces en el estudio de la frecuencia de inmersión; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados cuatro semanas después de la siembra.

Fuente de variación	Longitud brotes	Número hojas	Longitud lámina foliar	Ancho lámina foliar	Número raíces
Trat	1.21*	0.08 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.01 ^{ns}	1.37*
Error	0.07	0.08	0.05	0.002	0.26
Gl trat	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Gl error	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
C.V	10.76	9.90	10.45	5.71	15.59

ns= Diferencias no significativas *Diferencias significativas $p > 0.05$.

Cuadro 12 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud de raíces, longitud de explante, relación peso fresco parte aérea parte radical, incremento de peso fresco y coeficiente de multiplicación, en el estudio de la frecuencia de inmersión; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados cuatro semanas después de la siembra.

Fuente de variación	Longitud raíces	Longitud Explante	Relación parte aérea /raiz	Incremento de peso fresco	Coficiente de multiplicación
Trat	0.37 ^{ns}	0.65 ^{ns}	3.56 ^{ns}	0.37 ^{ns}	1.38*
Error	2.44	0.17	4.96	0.12	0.27
Gl trat	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Gl error	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
C.V	44.95	9.64	53.88	40.27	21.88

ns= Diferencias no significativas *Diferencias significativas $p > 0.05$.

Cuadro 13 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud del explante y coeficiente de multiplicación, en el estudio del volumen de medio; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados una semana después de la siembra.

Fuente de variación	Longitud Explante	Coeficiente multiplicación
Trat	0.116 ^{ns}	0.047 ^{ns}
Error	0.196	0.17
Gl error	6	6
Gl trat	2	2
C.V	9.43	76.12

ns diferencia no significativa

Cuadro 14 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud de brotes, longitud del explante, coeficiente de multiplicación, en el estudio del volumen de medio; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados dos semanas después de la siembra.

Fuente de variación	Longitud brotes	Longitud Explante	Coeficiente multiplicación
Trat	0.052 ^{ns}	0.035 ^{ns}	0.143 ^{ns}
Error	0.322	0.409	0.179
Gl error	6	6	6
Gl trat	2	2	2
C.V	23.42	13.70	38.48

ns diferencia no significativa

Cuadro 15 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud de brotes, número de hojas, longitud de lámina foliar y ancho de lámina foliar en el estudio del volumen de medio; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados tres semanas después de la siembra.

Fuente de variación	Longitud brotes	Número hojas	Longitud lámina foliar	Ancho lámina foliar
Trat	0.066 ^{ns}	0.33 ^{ns}	0.21 ^{ns}	1.37 ^{ns}
Error	1.38	0.33	0.24	0.43
Gl error	6	6	6	6
Gl trat	2	2	2	2
C.V	49.66	23.89	21.15	59.52

ns diferencia no significativa

Cuadro 16 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para el número de raíces, longitud de raíces, longitud de explante y coeficiente de multiplicación, en el estudio del volumen de medio; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados tres semanas después de la siembra.

Fuente de variación	Número raíces	Longitud raíces	Longitud Explante	Coficiente multiplicación
Trat	0.13 ^{ns}	0.26 ^{ns}	0.26 ^{ns}	0.47 ^{ns}
Error	0.47	3.38	0.80	0.56
Gl error	6	6	6	6
Gl trat	2	2	2	2
C.V	53.66	75.07	18.60	45.32

ns diferencia no significativa

Cuadro 17 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud de brotes, número de hojas, longitud de lámina foliar, ancho de lámina foliar y número de raíces, en el estudio del volumen de medio; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados cuatro semanas después de la siembra

Fuente de variación	Longitud brotes	Número hojas	Longitud lámina foliar	Ancho lámina foliar	Número raíces
Trat	0.97 **	0.83 ns	0.32 ns	0.91 ns	0.11 ns
Error	0.16	0.83	0.085	0.31	0.16
Gl trat	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Gl error	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
C.V	17.53	9.90	14.31	57.58	20.21

ns= Diferencias no significativas, ** Diferencias altamente significativas $p > 0.01$

Cuadro 18 A. Cuadrados medios, fuentes de variación y significancia para la longitud de raíces, longitud de explante, relación peso fresco parte aérea parte radical, incremento de peso fresco y coeficiente de multiplicación, en el estudio del volumen de medio; utilizando un biorreactor de inmersión temporal sobre la micropropagación de jengibre (*Zingiber officinale*, R.) variedad gran caimán. Santa Clara, San Carlos, evaluados cuatro semanas después de la siembra.

Fuente de variación	Longitud raíces	Longitud Explante	Relación parte aérea /raíz	Incremento Peso fresco	Coficiente de multiplicación
Trat	0.47 ns	0.65 ns	0.003 ns	0.13 ns	2.67 **
Error	1.04	0.29	0.001	0.099	0.22
Gl trat	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Gl error	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
C.V	31.29	12.60	2.99	83.85	20.76

ns= Diferencias no significativas, ** Diferencias altamente significativas $p > 0.01$

Cuadro 19 A. Prueba T para la variable número de brotes y longitud de explante como respuesta a dos medios de cultivo, uno convencional y otro en biorreactores de inmersión temporal en el cultivo de jengibre, *Zingiber officinale*, Santa Clara San Carlos, una semana después de la siembra.

VARIABLES	BIT	Semisólido	$\mu_{BIT} - \mu_{Semi}$	t (p)
Número de brotes	1.8125 (0.1652)	0.4375 (0.1493)	1.375	12.35 (.0001)
Longitud de explante	3.0750 (0.2062)	1.8300 (0.1851)	1.245	8.99 (.0001)

Cuadro 20 A. Prueba T para la variable número de brotes y longitud de explante como respuesta a dos medios de cultivo, uno convencional en medio semisólido y otro en biorreactores de inmersión temporal en el cultivo de jengibre (*Zingiber officinale*), Santa Clara San Carlos, dos semana después de la siembra.

VARIABLES	BIT	Semisólido	$\mu_{BIT} - \mu_{Semi}^*$	t (p)
Número de brotes	2.2025 (0.1634)	0.5250 (0.1708)	1.6775	14.20 (.0001)
Longitud de explante	3.3725 (0.2450)	2.2775 (0.2058)	1.095	6.84 (.0005)

*Diferencia de medias entre sistemas de inmersión temporal y el medio semisólido

Cuadro 21 A. Prueba T para la variable número de brote, ancho de lámina foliar, número de raíces, longitud de raíces, longitud de explante, como respuesta a dos medios de cultivo, uno convencional y otro en biorreactores de inmersión temporal en el cultivo de jengibre, *Zingiber officinale*, Santa Clara San Carlos, tercera semana después de la siembra.

Variables	BIT	Semisólido	$\mu_{BIT} - \mu_{Semi}^*$	t (p)
Numero de brotes	3.2025 (0.1634)	1.4250 (0.5500)	1.7775	6.20 (.0008)
Ancho de lámina foliar	0.7525 (0.0411)	0.6600 (0.0356)	0.0925	3.40 (.0145)
Numero de raíces	1.0025 (0.0818)	2.3500 (0.8185)	-1.3475	-3.28 (0.0169)
Longitud de raíces	1.4025 (0.411)	3.1775 (0.4495)	-1.775	-7.87 (.0002)
Longitud de explante	3.4525 (0.0818)	3.0375 (0.1702)	0.385	4.40 (.0046)

*Diferencia de medias entre sistemas de inmersión temporal y el medio semisólido

Cuadro 22 A. Prueba T para la variable número de brote, longitud del brote, número de hojas, longitud de lámina foliar, ancho de lámina foliar, número de raíces, longitud de raíces, longitud de explante, relación parte aérea/raíz, diferencia de peso como respuesta a dos medios, uno convencional y otro en biorreactores de inmersión temporal en el cultivo de jengibre, *Zingiber officinale*, Santa Clara San Carlos, cuarta semana después de la siembra.

Variables	BIT	Semisólido	$\mu_{BIT} - \mu_{Semi}^*$	t (p)
Número de brotes	4.4025 (0.6532)	1.9000 (0.5774)	2.5025	5.74 (0.0012)
Longitud del brote	2.0225 (0.1960)	1.8175 (0.4361)	0.205	0.86 (0.4241)
Numero de hojas	2.0025 (0.0050)	2.0000 (0)	0.0025	1 (0.3559)
Longitud de lámina foliar	0.8050 (0.5512)	1.4000 (0.3019)	-0.595	-1.89 (0.1071)
Ancho de lámina foliar	0.5025 (0.1063)	0.6650 (0.0911)	-0.1625	-2.32 (0.0593)
Numero de raíces	2.6025 (0.8165)	3.2750 (0.5737)	-0.6725	-1.35 (0.2264)
Longitud de raíces	1.7525 (0.4083)	4.0250 (0.5142)	-2.2725	-6.92 (0.0004)
Longitud de explante	3.1125 (0.4164)	3.0675 (0.3442)	0.045	0.17 (0.8732)
Relación parte aérea/ raíz	9.1425 (0.2269)	3.4625 (1.3627)	5.68	8.22 (0.0002)
Incremento de peso	0.5600 (0.0816)	0.8825 (0.3035)	-0.3225	-2.05 (0.0859)

*Diferencia de medias entre sistemas de inmersión temporal y el medio semisólido

Cuadro 23 A. Resultado del análisis de suelo sembrado de jengibre, *Zingiber officinale* Roscoe, el Coroso, de Guatuso, Alajuela, Costa Rica.

	pH	cmol(+)/L				mg/L				
		Acidez ext.	Ca	Mg	K	Cu	Mn	Fe	Zn	P
	5.09	0.69	8.65	2.96	0.26	15	96	127	2.3	4.15
Rangos aceptables	5.5	<0.5	4.0	1.0	0.2	1.0	5.0	5.0	3.0	10.0
	7.0	0.5	15.0	6.0	0.8	20.0	50.0	50.0	10.0	40.0
	Ca/Mg	Ca/K	Mg/K	(Ca+Mg)/K	C.I.C.E.	Saturación de acidez				
Rangos aceptables	2.92	33.27	11.38	44.65	12.56	5.49				
	2.0	5.0	2.5	10.0	>5	<10				

Cuadro 24 A. Número de nematodos fitoparásitos y de vida libre detectados en 100 g de suelo y 5 g de peso fresco de raíz en jengibre, *Zingiber officinale*, Roscoe, el Coroso de Guatuso, Alajuela, Costa Rica.*

Nematodo	Individuos en 100g de suelo	Individuos en 5 g de raíz
Helicotylenchus	10	0
Pratylenchus	2	21
Criconemoides	22	0
Nematodos de vida libre	42	3345

*Conteo realizado en el laboratorio de nematología de la Escuela de Agronomía del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Cuadro 25. Frecuencia, tiempo de inmersión y volumen de medio en sistemas de inmersión temporal en diferentes especies de interés agronómico. Recopilación de información.

Cultivo	SIT	Frecuencia de inmersión	Tiempo de inmersión	Volumen de medio	Coefficiente de multipli..	Referencia
Ananas comosus	BIT	2 h	30 min	_____	19	Da Silva et al. 2007
<i>Coffea arabica</i>	RITA	4 horas	1 min	_____	2 250	Alabarran et al (2005)
<i>cúrcuma cedoaria</i>	Filtración de polisulfona Nalgene® reutilizable	_____	15 min	_____	4.7	Stanly et al. (2010)
<i>Eucalyptus globulus</i>	BIT	12 h	2 min	_____	4.7	Gonzales et al. (2011)
<i>Musa</i>	BIT	3 h	4 min	_____	no reportado	Aragon et al. (2005)
<i>Theobroma cacao</i>	BIT	6 h	1 min	_____	159	niemenak et al (2008)
Banano Gran enano AAA	BIT	4 h	2 min	_____	7,5	Colmenares y Jiménez, 2003
<i>Musa</i> Vianda AAB		3 h	10 min	3600 ml	8,5	
<i>Zinziber zerumbet</i>	Filtración de polisulfona Nalgene® reutilizable	_____	15 min	_____	4.6	Stanly et al. (2010)
Jengibre <i>Zingiber officinale</i>	BIT	6	5 min	40 ml	4.40	Villegas, J. 2018

Cuadro 26. Diferencias de costos y ganancias entre el sistema de biorreactores de inmersión temporal y método convencional utilizando 15 unidades BIT en un plazo de un mes.

Método de Multiplicación	Coficiente de multiplicación	Plantas por unidad	Costo por planta	Total	Plantas producidas	Total con: (15 unidades)
BIT	4,4	44	₡ 500	₡ 22.000	660	₡ 330.000
Convencional	1,9	19	₡ 500	₡ 9.500	285	₡ 142.500
Diferencias	2,5	25	₡ -	₡ 12.500	375	₡ 187.500 *

*Ganancias del laboratorio utilizando 15 unidades BIT durante un mes.

Cuadro 27. Diferencias de costos y ganancias entre el sistema de biorreactores de inmersión temporal y método convencional utilizando 15 unidades BIT en un plazo de un mes.

Método de Multiplicación	Coficiente de multiplicación	Plantas por unidad	Costo por planta	Total	Plantas producidas	Total con: (15 unidades)
BIT	4,4	44	₡ 216	₡ 9.500	660	₡ 142.501
Convencional	1,9	19	₡ 500	₡ 9.500	285	₡ 142.500
Diferencias	2,5	25	₡ (284)*	₡ 0	375	₡ 1

*Ahorro por planta por parte del productor al utilizar 15 BIT durante un mes.