

UNIVERSIDAD NACIONAL POPULAR
ESCUELA AGRONÓMICA PANAMERICANA
APARTADO 95
TEGUCIGALPA HONDURAS

Propagación *in vitro* de jengibre

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado
Académico de Licenciatura
presentado por

300812

300812

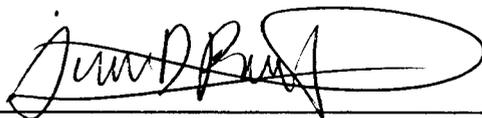
Juan Diego Peñaherrera Palacios

Zamorano, Honduras
Abril, 1998

MICROISIS:	115 11
FECHA:	Abril 4/98
ENCARGADO:	<i>Blas</i>

#875

El autor concede a Zamorano permiso
para reproducir y distribuir copias de este
trabajo para fines educativos. Para otras personas
físicas o jurídicas se reservan los derechos del autor.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Juan Diego Peñaherrera P.', is written over a horizontal line.

Juan Diego Peñaherrera P.

Zamorano, Honduras
Abril, 1998

DEDICATORIA

A mis padres, por su apoyo incondicional y confianza.

A Marcela por su paciencia y amor.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan José Alán por su amistad, su ayuda en la preparación de este proyecto y todos los jalones de orejas.

A la Ing. Agr. Dinie de Rueda, M. Sc. por su colaboración, su apoyo oportuno y la confianza brindada.

Al Dr. Pablo Emilio Paz por su apoyo.

A los Ingenieros: Julio Ventura, Rommel Reconco y Edgardo Varela por su amistad.

A los Doctores: Francisco Gómez y Wilfredo Colón por la ayuda brindada.

En general a todo el personal del Departamento de Agronomía, especialmente a Zoila Sandoval y a Olga Murillo por su colaboración.

Al Ing. Agr. Julio Hasing, por su apoyo moral, logístico y especialmente por su amistad.

Al Ing. Agr. Luis Arriaza por su amistad y ayuda.

Al Arquitecto Teodoro Albornoz por su colaboración en la parte fotográfica.

A mis amigos los Ing. Agr: Joffre Arregi, Augusto Terán, Alvaro Pérez, Edgar Freire, Ignacio Landivar, Juan José Olaechea, Alejandro Tonello, Jaime Del Carmen, Pedro Pablo Rodríguez, Enrique Duarte, Roderico Méndez, Juan Pagán, Mario Peña, Guillermo Toruño, Carlos Bravo, René Barrientos, Pedro Vargas, Jack Camino, Ricardo Zambrano, Andrés Macías, Gonzalo Coimbra, Cristian Chicaiza, Rodolfo Pacheco, Edwin Flores, Francisco Orozco, Miguel Yunez, Edison Jerez, Carlos Arias, y a todos de los que me olvido mencionar la, gratitud es grande la memoria pequeña. Por su amistad y momentos compartidos.

RESUMEN

Peñaherrera, Juan Diego. 1998. Propagación *in vitro* de jengibre. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, Zamorano, Honduras. 29 p.

En Honduras, los productores de jengibre para exportación han tenido dificultades debido a que usan como semilla el rechazo de las empacadoras al que le dan un mal manejo en almacén, lo que se traduce en una serie de problemas fitosanitarios. Una solución es propagar jengibre *in vitro*. El presente estudio se dirigió a buscar la mejor combinación de auxinas, ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolacético (AIA) y citoquininas kinetina (Kin) y bencil aminopurina (BAP). Se probó una citoquinina con una auxina mediante un factorial de cuatro dosis de cada una en un medio de Murashigue y Skoog (MS) modificado. La combinación más eficaz fue la de ANA con BAP. En la etapa de establecimiento se observó que el jengibre responde a dosis altas de BAP (5 y 7.5 mg/l). En la etapa de multiplicación en un medio de crecimiento de MS con 5 mg/l de BAP se pudo multiplicar satisfactoriamente, obteniéndose plantas completas con hojas y raíces listas para pasar a la etapa de aclimatación. Para esta etapa, se cultivaron en un invernadero en cajas de plástico (para mantener la humedad y la temperatura altas) en un medio orgánico previamente pasteurizado. Las plantas, luego de una etapa de dos semanas empezaron a crecer aceleradamente.

Palabras claves: ácido naftalenacético, bencil aminopurina, cultivo *in vitro*

NOTA DE PRENSA

PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE JENGIBRE: UNA OPCIÓN VIABLE PARA OBTENER PLÁNTULAS EN GRANDES CANTIDADES Y EN POCO TIEMPO

Los exportadores de jengibre en Honduras, han tenido problemas por bajos rendimientos, debido a que usan como semilla el rechazo de las exportadoras. Además, no almacenan la semilla adecuadamente por lo que se infecta de hongos y bacterias. Todo esto conduce a una disminución en los rendimientos y pérdidas económicas para los productores. Como una alternativa de solución a los problemas mencionados se propone la propagación de jengibre *in vitro*, es decir, en recipientes de vidrio que contienen un medio nutritivo adecuado para que las partes de las plantas (yemas de rizomas de jengibre) que se usan como propágulo se espera que formen nuevas plantas completas.

Las yemas no crecen únicamente con el medio nutritivo, también necesitan ciertas sustancias que permiten la formación de raíces, tallos y hojas. Estas sustancias son llamadas hormonas vegetales. Las hormonas que promueven el crecimiento de raíces son las auxinas, y las que promueven el crecimiento de tallos son las citoquininas. Hay diferentes tipos de auxinas y citoquininas, y dependiendo de la planta se necesitan diferentes cantidades y diferentes tipos de hormonas. Con el fin de conocer qué tipos de hormona y qué cantidades necesita el jengibre, en Zamorano se estableció un experimento en 1997. En este experimento se observó que el jengibre crece mejor con dosis bajas (0.5 mg por litro) de la auxina ácido naftalenacético (ANA) y la citoquinina bencil aminopurina (BAP) a una dosis entre 5 y 7.5 mg por litro de medio.

Una vez que se observa la formación de brotes y a veces de raíces, se dividen en porciones y se transfieren a un recipiente grande con el mismo medio nutritivo y con 5 ml de BAP para que crezcan y se multipliquen. En este medio se pudo apreciar que los brotes crecieron y formaron hojas además de raíces, lo que indicó que no era necesario pasarlos a otro medio para que formaran raíces.

Cuando las plantas tenían hojas y raíces se pasaron a un invernadero bajo condiciones de alta temperatura y alta humedad, en macetas con un medio formado por suelo orgánico y arena. A partir de la segunda semana empezaron a crecer rápidamente. Después de tres semanas estaban listas para cultivarse en el campo para la producción de semilla sana. El porcentaje de mortalidad en esta etapa fue muy bajo.

CONTENIDO

Portadilla	i
Autoría	ii
Página de firmas	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Resumen	vi
Nota de prensa	vii
Contenido	xiii
Indice de Cuadros	ix
Indice de Figuras	x
1 INTRODUCCIÓN	1
2 REVISIÓN DE LITERATURA	2
2.1 HISTORIA	2
2.2 PRODUCCIÓN	2
2.3 CONSUMO	3
2.4 USOS	3
2.5 BOTÁNICA Y DESCRIPCIÓN	3
2.6 CULTIVO	4
2.7 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE MERISTEMAS APICALES	4
2.8 MULTIPLICACIÓN MASIVA DE VEGETALES	5
2.9 MICROPROPAGACIÓN DEL JENGIBRE	5
2.9.1 Establecimiento	5
2.9.2 Multiplicación	6
2.9.3 Enraizamiento	6
2.9.4 Aclimatación	6
3 MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1 LOCALIZACIÓN	7
3.2 CÁMARA DE CRECIMIENTO	7
3.3 MATERIAL VEGETAL	7
3.4 CRISTALERÍA E INSTRUMENTOS	7
3.5 MEDIO DE CULTIVO	7
3.5.1 Preparación del medio	9
3.6 DESINFECCIÓN	9
3.7 DISECCIÓN Y CULTIVO	10
3.7.1 Etapa de establecimiento	10
3.7.2 Etapa de multiplicación	10
3.7.3 Etapa de aclimatación	10
3.8 VARIABLES ESTUDIADAS	11
3.8.1 Establecimiento	11
3.8.2 Multiplicación	11

3.8.3	Aclimatación	11
4	RESULTADOS	12
4.1	EFFECTO DE LA COMBINACIÓN DE ANA O AIA CON BAP O KIN SOBRE YEMAS DE JENGIBRE	12
4.2	EFFECTOS DE ANA Y BAP EN LA ETAPA DE ESTABLECIMIENTO	13
4.3	ETAPA DE MULTIPLICACIÓN	20
4.4	ETAPA DE ACLIMATACIÓN	22
5	DISCUSIÓN	24
5.1	ESTABLECIMIENTO	24
5.2	EXPERIMENTO DE DIFERENTES DOSIS DE ANA CON BAP	24
5.3	MULTIPLICACIÓN	25
5.4	ACLIMATACIÓN	25
6	CONCLUSIONES	26
7	RECOMENDACIONES	27
8	BIBLIOGRAFÍA	28

ÍNDICE DE CUADROS**Cuadro**

1. Medio de cultivo utilizado en la etapa de establecimiento y multiplicación formado por las sales minerales de Murashigue y Skoog y complementos orgánicos. 8
2. Combinaciones de diferentes dosis de auxinas y citoquininas. 9
3. Formación de brotes, callos o raíces a partir de yemas apicales de jengibre utilizando varias dosis de AIA y BAP. 12
4. Formación de brotes, callos o raíces a partir de yemas apicales de jengibre utilizando varias dosis de ANA y BAP, a los 68 días de siembra. 13
5. Explantes sobrevivientes que produjeron callos, brotes o raíces en la etapa de establecimiento con ANA y BAP a los 68 días de trasplante. 13

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

1. Yema apical de jengibre desprendiendo brácteas. Se puede observar la formación de callo. 16
2. Yema apical de jengibre con brotes y raíces a los 35 días de sembrada. 17
3. Yema apical de jengibre que formó brotes y raíces con 5 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de ANA, a los 68 días de siembra. Nótese que los brotes parten de yemas laterales preexistentes. 18
4. Yema apical de jengibre que formó brotes y raíces con 7.5 mg/l de BAP y 1 mg/l de ANA, a los 68 días de siembra. 19
5. Plántulas de jengibre en multiplicación provenientes de una sección de un explante que creció en un medio con 5 mg/l de BAP y 1.5 mg/l de ANA. 21
6. Planta de jengibre en crecimiento, luego de tres semanas de transferida al suelo en el invernáculo. Nótese que las primeras hojas formadas *in vitro* murieron. 23

1. INTRODUCCIÓN

El jengibre (*Zingiber officinale*) es originario de Asia. Es una planta de gran importancia económica debido a sus usos como especia y en medicina. Se propaga normalmente por medio de rizomas, lo que constituye un problema, porque se pueden transmitir enfermedades y nemátodos que merman considerablemente la productividad.

El mal manejo del rizoma que se usa como semilla aumenta el riesgo de transmisión de enfermedades. Tal es el caso de Honduras, en donde los rendimientos son bajos debido a que el material de rechazo de las exportaciones se usa como semilla. Además, no existe un proceso adecuado de curado durante el almacenamiento previo a la siembra y se hace un uso inapropiado de plaguicidas para tratar de combatir los hongos parásitos.

Cerca de un 80% los productores en Honduras tienen problemas durante el proceso de seleccionado, manejo y almacenamiento de la semilla, que se incrementa al aumentar las áreas de producción. Son pocos los productores que, a nivel nacional, le dan importancia al buen manejo de la semilla. Las pésimas condiciones de almacenamiento favorecen la aparición y el desarrollo de hongos como *Fusarium sp.* y *Pythium sp.* y de bacterias como *Erwinia sp.* y *Pseudomonas sp.*, responsables de las pérdidas durante esta fase (Ramírez, 1996).

De ahí la importancia de su propagación *in vitro*, pues así se aseguraría la obtención de semilla sana, en grandes cantidades y en un menor tiempo.

En Zamorano se ha estudiado la micropropagación *in vitro* del jengibre. Se han evaluando los efectos de algunas hormonas, en diferentes concentraciones, en el medio de Murashigue & Skoog (MS) (1962). Además, se trabajó en la desinfección del material vegetal, probando varios fungicidas, bactericidas y alcohol en varias concentraciones y tiempos de contacto hasta que se consiguió una combinación eficaz para la desinfección y el posterior trabajo de propagación. En el presente trabajo se trató de comprobar los resultados obtenidos anteriormente, además de probar otras hormonas y llegar a la etapa de aclimatación de plántulas de jengibre propagadas *in vitro*.

Los objetivos generales del trabajo fueron multiplicar masivamente plantas de jengibre y su aclimatación. El objetivo específico fue probar combinaciones de las auxina ácido naftalenacético (ANA) y ácido indolacético (AIA), y las citoquininas bencil aminopurina (BAP) y kinetina (Kin) en la multiplicación masiva de jengibre.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

Desde 1989, en Honduras se inició la exportación de jengibre hacia diferentes partes del mundo. Los rendimientos han sido muy bajos durante casi todo este período por razones de mal manejo de la semilla (Ramírez, 1996).

Se exporta el mejor material producido y el rechazo es utilizado como semilla. Además, este rechazo, es mal manejado y generalmente no es sometido a selección, a un curado y a un proceso de cicatrización de los cortes. Por un período de tres años los productores emplearon para el curado un solo producto (Benomil en dosis inadecuadas), lo que ha dado lugar a problemas de resistencia de los hongos. Durante la etapa de almacenamiento, la semilla no es revisada periódicamente cuando son colocadas en bolsas de polietileno para estimular el desarrollo de brotes, en donde las condiciones de alta temperatura y alta humedad favorecen el rápido desarrollo de enfermedades (Fúnez, s.f.).

2.1 HISTORIA

Es una de las especias más conocidas. Desde los tiempos más remotos se empleaba en China y en la India. El nombre de Zingiber, del cual se ha derivado el de jengibre, debió, ser tomado, según se cree, del sánscrito “sanjabil”, que dio “zanzabil” en árabe. Los antiguos griegos y romanos lo apreciaban mucho; y lo obtenían por medio de comerciantes árabes que lo traían de la India (Maistre, 1989).

Su uso fue introducido a Francia y Alemania en el siglo IX y a Inglaterra en el siglo X. La planta fue introducida en América poco después del descubrimiento. A México la introdujo Francisco de Mendoza, hijo del virrey de este territorio. De allí pasó pronto a las Antillas, especialmente a Jamaica, que en 1547 ya exportaba 1100 toneladas de rizomas a España y ha continuado desde entonces como uno de los principales países productores de jengibre (Maistre, 1989).

2.2 PRODUCCIÓN

Cierto número de países productores de jengibre son al mismo tiempo consumidores. Por esta razón, es difícil dar una cifra exacta del conjunto de la producción anual mundial de jengibre. Sin embargo, se puede estimar en total en unos cuarenta millones de toneladas aproximadamente. Las únicas informaciones sobre la producción mundial que se conocen son las siguientes: India 16700 t, Jamaica 1600 t, Sierra Leona 2000 t, Nigeria 1200 t,

Ceilán 3500 t, China Continental 4000 t, Formosa 6000 t, lo que representa un total de 35000 t (Maistre, 1989).

Según Ramírez (1996), en Honduras, este cultivo ha encontrado gran aceptación para explotaciones comerciales, y desde 1989 se comenzó a exportar, por lo que las áreas de producción se han incrementando.

2.3 CONSUMO

Los principales consumidores son algunos países productores, tales como la India, Ceilán, China Continental, pero también los países árabes (Adén, Arabia Saudita, Egipto), los Estados Unidos e Inglaterra (Maistre, 1989).

Tradicionalmente, el jengibre se había consumido internamente en los países productores, pero a medida que la población asiático - oriental, hindú y árabe ha emigrado, la demanda ha aumentado considerablemente (El Salvador, Fundación Salvadoreña para el Desarrollo Económico y Social, 1994).

2.4 USOS

Los rizomas son utilizados extensamente como condimento; en forma fresca, seca (especia) o en conserva, salmuera, enlatado, etc. Adicionalmente, este producto es muy utilizado en la fabricación de algunas bebidas (El Salvador, Fundación Salvadoreña para el Desarrollo Económico y Social, 1994). La industria médica lo utiliza en la fabricación de carminativos y aromáticos para el tracto gastrointestinal y respiratorio. En el pasado, el jengibre adquirió reputación de afrodisiaco y fue extensamente usado en la India y el Medio Oriente para tal propósito (El Salvador, Fundación Salvadoreña para el Desarrollo Económico y Social, 1994).

2.5 BOTÁNICA Y DESCRIPCIÓN

El jengibre (*Zingiber officinale*) pertenece a la familia de las Zingiberáceas. La planta se forma de un rizoma subterráneo del que parten vástagos aéreos, cubiertos por las vainas envolventes de las hojas. La planta alcanza hasta un metro de altura; el follaje es de color verde pálido. Normalmente hay un escapo floral que parte del rizoma. Los rizomas del jengibre son tallos monopodiales, hasta de 50 centímetros de largo (León, 1987).

Cuando se cosechan maduros, esto es, una vez seca la parte aérea de la planta, los rizomas frescos de jengibre se presentan en forma de órganos irregulares, alargados, del grueso de un dedo pulgar con ramificaciones obtusas en el mismo plano. Se les designa como manos y son tanto más apreciadas cuanto más rectilíneas y desarrolladas son sus ramificaciones o dedos. El volumen y peso varían según las condiciones ecológicas y el

esmero con que se ha llevado a cabo el cultivo. Las manos más gruesas pueden pesar más de 200 g y medir 15 cm o más, mientras que los dedos suelen tener de 3 a 6 cm de largo por uno o dos de ancho. La mayor parte de los autores coincide en que el fruto es desconocido. Otros afirman que es raro y que se presenta en forma de cápsula de paredes alargadas, trilobular, dividido en varias celdas que se abren en tres válvulas y contiene un cierto número de semillas negras, pequeñas y angulosas (Maistre, 1989).

2.6 CULTIVO

Requiere de clima tropical a subtropical con temperaturas entre 25 y 30 grados centígrados y precipitación mayor de 2000 mm anuales distribuidos durante todo el año. Los suelos sueltos con alto contenido de materia orgánica, con buen drenaje, son los más recomendados. La semilla son trozos de rizoma; se siembra a una densidad de 20,000 plantas por hectárea. La distancia entre plantas es de 0.40 m entre plantas y 1.30 m entre surco. La cosecha se lleva a cabo de nueve a diez meses después de la siembra (Solano, 1991).

2.7 CULTIVO *IN VITRO* DE MERISTEMAS APICALES

De todos los tejidos utilizados para la micropropagación se prefieren los meristemas ya que pueden regenerar plántulas completas más rápidamente que los tejidos de otras fuentes. Las plántulas regeneradas usualmente tienen las características genéticas de los progenitores debido a la naturaleza diploide de las células meristemáticas (Murashige, 1974).

Desde los años 60, cuando se descubrió la capacidad que tienen las puntas de los brotes y los meristemas de orquídeas, cortados apropiadamente y sembrados en un cultivo aséptico para crecer y desarrollarse en plántulas (Morel, 1964), estos explantes han sido utilizados para propagar otras plantas, mantener y multiplicar los materiales genéticos. De una punta de brote cultivado o de un explante, en algunos casos, se regenera una planta y en otros casos se puede estimular la formación de brotes múltiples (Styer y Chin., 1983).

En realidad, en cada uno de estos casos se espera a menudo lograr la formación de ramas axilares que puedan separarse y enraizarse; teóricamente los brotes axilares o laterales pueden a su vez producir ramas axilares adicionales a perpetuidad, a medida que se subcultiva cada brote recién formado o cada explante de nudo. Por lo tanto, el método es bueno para obtener una rápida multiplicación clonal y se ha aplicado a una gran variedad de especies, desde las herbáceas hasta las leñosas (Krikorian, 1982).

El estudio detallado *in vitro* de los requerimientos nutricionales, hormonales y ambientales nos ayuda a entender los mecanismos reguladores que controlan la diferenciación de las plantas. De aquí la gran importancia de los meristemas de la planta, pues se encuentran asociados con células altamente diferenciadas, además de que dan

origen a diverso tipo de células, tejidos y órganos para formar una planta completa. También, se perpetúan a sí mismos, produciendo células que retienen su actividad meristemática (Navarro, 1988).

2.8 MULTIPLICACIÓN MASIVA DE VEGETALES

La facilidad de usar la técnica de cultivo de tejidos vegetales para la multiplicación masiva es que produce material vegetal in vitro por la iniciación de brotes adventicios, bulbos, tubérculos, embriones asexuales o por crecimiento de brotes de yemas axilares y producción masiva de plántulas a partir de meristemas (Hurtado y Merino, 1988).

Los propagadores comerciales tienen estandarizado el método de mantenimiento de un lote comercial de material madre in vitro, en el que además de tener la ventaja de mantener este material, se mantiene un gran número de plántulas en un espacio reducido con las condiciones ambientales requeridas y la calidad y sanidad deseables. Esto es debido al potencial morfogenético que tienen los meristemas y otros tejidos de la planta en la producción masiva de brotes (Hurtado y Merino, 1988).

2.9 MICROPROPAGACIÓN DEL JENGIBRE

Las flores del jengibre aparentemente no producen frutos por lo que no hay sistemas de propagación sexual (Malamug et al. 1991). La propagación debe hacerse vegetativamente mediante rizomas; sin embargo, la tasa de multiplicación obtenida es muy baja, además de que facilita la diseminación de diversas plagas y enfermedades (Chen-Han y Jiménez, 1994). Esto hace que la micropropagación por cultivo de tejidos in vitro para la propagación del jengibre sea una opción rentable. La propagación clonal por medio de cultivo de tejidos se ha dividido en cuatro etapas: establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatación (Murashigue, 1974).

2.9.1 Establecimiento

Zelaya, (1997) informa que yemas apicales y axilares de jengibre en un medio de iniciación de MS que contenía ácido naftalenacético (ANA) como auxina y bencil amino purina (BAP) como citoquinina, produjeron brotes y callos, pero no logró determinar las dosis óptimas de cada hormona debido a la gran contaminación endógena de los explantes que usó. En jengibre rojo (*Alpinia purpurata*), planta ornamental perteneciente a la misma familia esta etapa dura normalmente 30 días (Chen-Han y Jimenez, 1994). En el experimento realizado por Zelaya obtuvo respuestas de los explantes después de los 40 días luego de la siembra.

2.9.2 Multiplicación

Para jengibre rojo, los explantes, que son los hijuelos formados en la base de las brácteas florales partidos por la mitad, fueron transferidos al medio de MS con una concentración alta de BAP (4 mg/l). El período de formación de brotes dura aproximadamente 30 días, pudiéndose hacer ciclos de multiplicación mensuales (Chen-Han y Jiménez, 1994). Zelaya (1997) indicó que las Zingiberáceas necesitan alrededor de 5mg/l de BAP para inducir la multiplicación.

2.9.3 Enraizamiento

Chen-Han y Jiménez (1994) indican que transfirieron los brotes desarrollados para que formaran raíces y así obtener plantas completas in vitro. En esta etapa, usaron el medio de MS y generalmente, suprimen las citoquininas y utilizaron ANA en una dosis de 0.5 mg/l. A los 30 días (con jengibre rojo), aproximadamente, obtuvieron una buena relación entre las raíces y el follaje. Hay ciertas especies que no necesitan una etapa de enraizamiento pues forman raíces en la etapa de multiplicación o en el invernadero de aclimatación sin mayores problemas.

2.9.4 Aclimatación

Pierik (1990) informa que una planta originada in vitro difiere en muchos aspectos de las que se originan in vivo. Tienen una cutícula escasamente desarrollada debido a la alta humedad relativa dentro del tubo de ensayo; por lo tanto, hay mayor transpiración y las hojas son fotosintéticamente poco activas. Los estomas de la planta no son suficientemente operativos y permanecen abiertos cuando han pasado al suelo. Lo anterior conduce a un estrés hídrico y a la carencia de azúcares, por lo que es necesario brindar un trato especial a estas plantas. Generalmente, lo que se hace es mantener la humedad relativa alta en el ambiente al que pasan, por medio de riegos por aspersión o en cajas de plástico, además de una fertilización foliar y riegos frecuentes ya que tienen raíces poco funcionales

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LOCALIZACIÓN

Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología y en los invernaderos del Departamento de Agronomía, Zamorano.

3.2 CÁMARA DE CRECIMIENTO

La cámara de crecimiento tiene las siguientes características: temperatura de 25 grados centígrados ± 1 , un fotoperíodo de 16 horas de luz y 54 micromol/m²/s-1, tiene estantería de madera y la fuente de luz queda alrededor de 50 cm de los recipientes de cultivo.

3.3 MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron rizomas de cosecha reciente, de los cuales se extrajeron las yemas tanto apicales como laterales. Para la extracción de las yemas, los rizomas fueron inducidos a brotación, dentro de sacos de plástico, por un tiempo aproximado de tres semanas, manteniéndolos a temperaturas y humedades altas en el invernadero. La mayoría del material vegetal provenía de las cercanías del lago de Yojoa departamento de Cortés, Honduras, lo demás se consiguió de los invernaderos del Departamento de Agronomía.

3.4 CRISTALERÍA E INSTRUMENTOS

La cristalería se lavó con detergente, se enjuagó con abundante agua de la cañería y al menos tres veces con agua bidestilada. Se secó en un horno a temperatura constante de 120 grados centígrados durante cuatro horas. Las pipetas, frascos volumétricos y probetas se secaron al aire.

3.5 MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo que se utilizó fueron las sales de MS (Murashigue y Skoog, 1962), complementado con compuestos orgánicos (Cuadro 1). El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.8 antes de la esterilización.

Cuadro 1. Medio de cultivo utilizado en la etapa de establecimiento y multiplicación formado por las sales minerales de Murashigue y Skoog y complementos orgánicos.

Sales minerales de MS	(mg/l)
NH₄NO₃	1650.00
KNO₃	1900.00
KH₂PO₄	170.00
CaCl₂. 2H₂O	440.00
MgSO₄. 7H₂O	370.00
KI	0.83
H₃Bo₃	6.20
MnSO₄. 4H₂O	22.30
ZnSO₄. 7H₂O	8.60
Na₂MoO₄. 2H₂O	0.25
CuSO₄. 5H₂O	0.025
FeSO₄. 7H₂O	27.80
Na₂ EDTA	37.30
CoCl₂. 6H₂O	0.025
Compuestos Orgánicos	
Inositol	100.00
Tiamina (Vit. B1)	0.001
Glicina	4.00
Piridoxina(Vit.B6)	0.001
Ac. nicotínico	0.001
Sacarosa	30000.00
Phytigel	3500.00
pH	5.8

Las citoquininas que se utilizaron fueron bencil amino purina (BAP) o kinetina (Kin), y las auxinas fueron el ácido indol acético (AIA) o ácido naftalenoacético (ANA). Se combinaron por medio de un factorial de 4×4 , en experimentos en que se estudiaron una citoquinina y una auxina a la vez. De estas combinaciones resultaron cuatro experimentos. Para cada combinación de hormonas, el factorial 4×4 representaba cuatro concentraciones de auxinas y cuatro de citoquininas. Las concentraciones de auxinas fueron: 0, 0.5, 1 y 1.5 mg por litro de medio y las de citoquininas: 0, 2.5, 5 y 7.5 mg por litro de medio (Cuadro 2).

Cuadro 2. Combinaciones de diferentes dosis de auxinas y citoquininas

		Citoquinina			
		0	2.5	5.0	7.5
Auxina	0	0 ; 0	0 ; 2.5	0 ; 5	0 ; 7.5
	0.5	0.5 ; 0	0.5 ; 2.5	0.5 ; 5	0.5 ; 7.5
	1.0	1 ; 0	1 ; 2.5	1 ; 5	1 ; 7.5
	1.5	1.5 ; 0	1.5 ; 2.5	1.5 ; 5	1.5 ; 7.5

3.5.1 Preparación del medio

Para la preparación del medio de cultivo se usaron soluciones madres de los macro nutrientes (concentrada 10 veces), micronutrientes (concentrada 1000 veces) y de FeNa-EDTA (concentrada 200 veces). La cantidad de solución madre se colocaba en un "beaker" y luego de añadir agua bidestilada se aforaba a un litro, los otros componentes se colocaron a la solución que estaba sobre un agitador horizontal magnético.

El medio preparado se transfirió, con la ayuda de una jeringa automática, a tubos de ensayo de 18 × 150 mm, los que se taparon con tapas de plástico. Los tubos se marcaron previamente con el número del tratamiento correspondiente. Se utilizaron 6 mililitros de medio por cada tubo de ensayo.

De un litro de medio se obtuvieron 10 tubos de cada tratamiento, considerándose cada tubo como una repetición. Los tubos con medio de cultivo se esterilizaron en un autoclave a 121 grados centígrados (259 grados Fahrenheit) y a 1.06 kg / cm² (15 libras por pulgada cuadrada) de presión durante 20 minutos.

3.6 DESINFECCIÓN

Cuando se observaban claramente las yemas laterales y los brotes tenían cerca de dos centímetros de altura, los rizomas se lavaron con una solución jabonosa. Para su desinfección fueron sumergidos en una solución acuosa de estreptomina al 1.5%, sulfato de cobre al 1% y carbendazim al 1%, durante 24 horas. Luego, los brotes fueron cortados con suficiente tejido y sumergidos en la misma solución desinfectante por 12 horas. Después, se sumergieron en alcohol etílico al 70% durante 30 segundos (Zelaya, 1996), y en hipoclorito de calcio al 1% e hipoclorito de sodio al 1% por 20 minutos en cada uno. Luego, en la cámara de flujo laminar se realizaron tres enjuagues con agua bidestilada estéril para eliminar el exceso de desinfectante.

Se usaron pinzas, bisturíes y agujas hipodérmicas, que se esterilizaron flameándolos en la llama de un mechero de alcohol antes de cada operación. Durante el tiempo que no se usaban, permanecieron sumergidos en alcohol al 70%. Los instrumentos se enfriaron en agua bidestilada estéril antes de cada operación para no dañar los tejidos

3.7 DISECCIÓN Y CULTIVO

La disección realizó en la cámara de flujo laminar. A los brotes se les removieron las yemas bajo un estereoscopio, a las que se les quitaron algunas de las brácteas que las recubren. Los ápices se disecaron utilizando pinzas, bisturíes y agujas hipodérmicas. La disección se hizo sobre discos de papel filtro esterilizado en el autoclave en platos Petri. Cuando el explante fue extraído se colocó, usando una pinza en el tubo de ensayo que contenía el medio. La boca del tubo se flameó en el mechero al abrirlo y antes de taparlo. Al final el tubo se selló con Parafilm.

3.7.1 Etapa de establecimiento

Una vez que las yemas se sembraron en los tratamientos correspondientes se trasladaron a la cámara de crecimiento para su incubación.

3.7.2 Etapa de multiplicación

Los brotes de cada explante fueron separados en la cámara de transferencia y transferidos al medio de MS con los mismos aditivos orgánicos y con una concentración de 5 miligramos por litro de BAP, y se incubaron en la cámara de crecimiento.

3.7.3 Etapa de aclimatación

Cuando las plantúlas estaban lo suficientemente grandes (3 cm en adelante), fueron transferidas a un invernadero, subcultivándose el callo restante, que contenía brotes aún pequeños para ser pasados al invernáculo. Se transplantaron a un medio orgánico previamente esterilizado y se colocaron en cámaras de crecimiento de plástico dentro del invernáculo se mantuvieron a temperatura y humedad relativa elevadas. Antes del trasplante el medio de cultivo pegado al las raíces fue lavado por completo. Se regaron dos veces por día y fueron sometidas a una fertilización foliar por semana, con la fórmula 20 - 20 - 20, a razón de 10 g por litro de agua. Además, fueron tratadas semanalmente con una solución acuosa de estreptomina al 1.5%, sulfato de cobre al 1.5% y carbendazim al 1%

3.8 VARIABLES ESTUDIADAS

Las variables que se estudiaron fueron las descritas a continuación.

3.8.1 Establecimiento

- Sobrevivencia.- se observó si el explante sobrevivía en el cultivo *in vitro*.
- Formación de callos.- se observó si el explante formó, y en qué tiempo lo formó
- Tamaño de los callos.- al final de la etapa se midió el diámetro aproximado del callo.
- Número de brotes por explante.- al final de la etapa se contaron los brotes que produjo el explante
- Altura del brote.- se midió al final de la etapa, desde la base del explante hasta la punta del brote.
- Promedio de brotación por tratamiento

3.8.2 Multiplicación

- Número de brotes por explante.
- Promedio de brotación por tratamiento.
- Formación de raíces.- se observó si los brotes tenían raíces.
- Longitud de los brotes.

3.8.3 Aclimatación

- Porcentaje de Supervivencia.- se sacó la relación de plantas muertas en invernadero contra el total de plantas transferidas a aclimatación.
- Crecimiento semanal.- se midió la altura de las plantas semanalmente, desde la base hasta la hoja más alta.

4. RESULTADOS

Todos los experimentos presentaron contaminación a pesar del tratamiento con bactericida y fungicida; la contaminación fue alta y varió entre el 51% y el 68%. El 66% de la contaminación fue por hongos, lo restante por bacterias. El segundo grupo de repeticiones del experimento con ANA Y BAP se contaminó 100% debido a bacterias, pese a que se siguió el mismo procedimiento de desinfección. La contaminación se debió, posiblemente, al mayor tiempo de almacenado de los rizomas. Para el tercer grupo de repeticiones se consiguió material fresco, producido en invernadero. Las plantas de las que provenían fueron tratadas semanalmente con fungicidas y bactericidas durante todo el ciclo de crecimiento. La contaminación disminuyó a un 40%. En la etapa de multiplicación la contaminación fue de 2 %, en su totalidad por hongos. En los subcultivos la contaminación fue de 0.5%, también por de hongos.

4.1 EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE ANA O AIA, CON BAP O KIN, SOBRE YEMAS DE JENGIBRE

En los experimentos en los que se usó Kin las yemas de jengibre no respondieron. Los explantes conservaron su color verde por pocos días. A los quince días, aproximadamente la mayoría de las yemas tenían la base blanca y el extremo superior ennegrecido.

Los tres explantes (Cuadro 3) que respondieron en el experimento de AIA y BAP formaron callos que eran casi blancos con pocas manchas verdes, sin producir brotación. Los otros explantes permanecieron sin cambiar su color verde durante diez días, aproximadamente. A los 15 días la mayoría presentaba la base blanca y el extremo superior ennegrecido y otros estaban completamente blancos. Así permanecieron hasta que fueron retirados de la cámara de crecimiento a los cuarenta y cinco días de sembrados.

CUADRO 3. Formación de Brotes, callos o raíces a partir de yemas apicales de jengibre utilizando varias dosis de AIA y BAP.

		BAP (mg/l)			
		0	2.5	5.0	7.5
AIA (mg/l)	0	0/9	0/8	0/3	0/3
	0.5	1/9	2/3	0/0	0/3
	1.0	0/5	0/3	0/1	0/8
	1.5	0/5	0/0	0/0	0/6

4.2 EFECTOS DE ANA Y BAP EN LA ETAPA DE ESTABLECIMIENTO

En los 41 brotes sobrevivientes en el primer experimento con ANA y BAP (Cuadro 4) se comenzó a observar respuesta a los ocho días de la transferencia. Los explantes empezaron a expandir las brácteas que los recubrían, mostrando un ligero aumento en el tamaño (Figura 1). A los quince días de sembrados se pudo notar la formación de callos de color verde claro o blancos, de apariencia granular y friables. A los treinta y cinco días se empezaron a observar algunas raíces, especialmente en los tratamientos con citoquinina. Ciertos brotes crecieron a partir de las yemas del explante (Figura 2) y a los sesenta y ocho días había algunos de cerca de 5 mm. Otros apenas se notaban.

Cuadro 4. Formación de brotes, callos o raíces a partir de yemas apicales de jengibre utilizando varias dosis de ANA y BAP, a los 68 días de siembra.

		BAP (mg/l)			
		0	2.5	5.0	7.5
ANA (mg/l)	0	1/1	1/1	8/8	1/1
	0.5	4/6	4/7	6/8	2/3
	1.0	4/5	3/4	5/6	2/4
	1.5	3/3	9/9	8/8	1/2

En el Cuadro 5 se representan los números y porcentajes de explantes que sobrevivieron y produjeron callos, brotes o callos y raíces, a los 68 días después de la siembra.

En el experimento anterior se notó que hubo mejor respuesta a la combinación de ANA y BAP por lo que se procedió a realizar más repeticiones, haciendo 20 réplicas más de cada tratamiento, en dos grupos

Cuadro 5. Explantes sobrevivientes que produjeron callos, brotes o raíces, en la etapa de establecimiento con ANA y BAP a los 68 días de trasplante.

ANA (mg/l)	BAP (mg/l)							
	0		2.5		5.0		7.5	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
0	1/6	16	2/6	33	7/13	54	2/7	29
0.5	1/11	9	2/9	22	0/10	0	8/10	80
1.0	2/12	16	2/4	50	3/9	33	6/9	66
1.5	0/11	0	6/13	46	7/13	54	5/8	63

Solo una yema del tratamiento sin hormonas formó un callo al comienzo, era grande, de color verde claro y friable y con una raíz gruesa con brotes pequeños que provenían de las yemas que rodeaban a la yema apical. Las otras cinco formaron callos blanquecinos, de 2 mm de diámetro en promedio, sin que se diferenciaron brotes y raíces.

Con 0.5 mg de ANA por L de medio, y en ausencia de citoquininas, solo un explante de los once sobrevivientes produjo un callo, de color verde claro, de apariencia granular y friable, que se observó claramente a los 35 días. A los 68 días de cultivo había producido cinco brotes, que partían de las yemas circundantes, dos de ellos de 5 mm de longitud, y los restantes de menos de 2 mm, además de raíces gruesas y lisas. Los dos explantes del tratamiento con 1 mg de ANA y 0 de BAP por L de medio, produjeron callos de color blanco opaco de unos 3 mm de diámetro en promedio. No se produjo desarrollo ni diferenciación de órganos. En el tratamiento de 1.5 mg ANA y 0 de citoquinina por L ninguna yema respondió. Conservaron su color verde por poco tiempo, luego se tornaron blancas y así permanecieron hasta que se retiraron de la cámara de crecimiento.

Con 2.5 mg BAP y 0 de ANA por L se produjeron callos en dos de los seis explantes sobrevivientes. Tenían aproximadamente 5 mm de diámetro. Uno de los explantes produjo cuatro brotes que partían de las yemas laterales y tenían entre 3 y 5 mm de longitud, el otro produjo dos brotes de iguales características. Los callos eran de color verde claro de apariencia granular y friable. Ambos explantes produjeron raíces. Los cuatro callos restantes permanecieron completamente blancos, de más o menos 3 mm de diámetro, sin órganos apreciables.

En el tratamiento con 2.5 mg de BAP de y 0.5 mg de ANA por L de medio se formaron dos callos. Los explantes formaron cuatro brotes cada uno, y fueron el desarrollo de las yemas contenidas en el explante, algunos midieron casi 5 mm de altura; todos tenían raíces. Los siete explantes restantes no crecieron, eran blanquecinos y de unos 3 mm de diámetro.

En el tratamiento con 2.5 mg de BAP y 1 mg de ANA por L, cuatro explantes sobrevivieron, dos se diferenciaron formando brotes y varias raíces, (uno con tres brotes y otro con cuatro). Los explantes tenían algo más de 1 cm de diámetro, y los brotes median entre 2 y 5 mm de altura. En el tratamiento con 2.5 mg de BAP y 1.5 mg de ANA por L de medio, seis explantes formaron órganos de trece sobrevivientes. El número de brotes varió entre uno y seis y sus alturas variaron entre 2 y 6 mm aproximadamente. Los seis explantes produjeron raíces. Los explantes que no se diferenciaron produjeron callos que crecieron hasta tener un diámetro de 4 mm aproximadamente y de color blanquecino.

De los trece explantes del tratamiento con 5 mg de BAP y 0 mg de ANA por L de medio, en ocho explantes se produjeron brotes y raíces, cuatro de éstos tenían un solo brote de casi 6 mm de altura. Un explante produjo dos brotes a partir de sus yemas, de la misma altura aproximadamente. Los dos explantes restantes produjeron de cuatro a seis brotes, con alturas que variaron entre 3 y 5 mm. Los explantes que no se diferenciaron fueron blanquecinos y de unos 4 mm de diámetro.

En el tratamiento con 5 mg de BAP y 0.5 mg de ANA por L, los diez explantes formaron callos hasta llegar a un diámetro de 4 mm, sin que el explante o el callo produjeran órganos.

De los nueve explantes del tratamiento con 5 mg de BAP y 1 mg de ANA por L de medio, tres formaron brotes y raíces. Dos explantes produjeron brotes de aproximadamente 5 mm de altura, el otro explante produjo dos brotes, uno de casi 3 mm de altura y el otro de menor longitud. Los seis explantes restantes formaron callos, pero no brotes.

En el tratamiento con 5 mg de BAP y 1.5 mg de ANA por L de medio, en siete explantes de trece se produjeron brotes y raíces. Un explante produjo ocho brotes de tamaño variable y este fue el de mayor brotación en el experimento. La mayoría de explantes produjeron raíces. Los otros produjeron entre dos y cinco brotes cada uno. Los explantes alcanzaron aproximadamente 1.5 cm de diámetro (Figura 3).

Con 7.5 mg de BAP por L de medio y sin ANA, dos explantes de siete formaron órganos. Uno formó tres brotes visibles y el otro produjo uno. Los diámetros de los explantes variaron entre 5 mm y 1 cm y eran de color verde claro.

Con 7.5 mg de BAP y 0.5 mg de ANA por L de medio ocho de diez explantes brotaron y formaron raíces. El número de brotes varió entre uno y seis. Los explantes midieron 1.5 cm de diámetro aproximadamente, y los brotes alcanzaron hasta 1 cm de altura.

De los nueve explantes del tratamiento con 7.5 mg de BAP y 1 mg de ANA por L de medio, seis produjeron órganos. Los explantes eran de color verde claro, tenían entre 1.4 a 1.5 cm de diámetro. Todos los explantes formaron brotes y raíces, los brotes median entre 0.5 y 1.2 cm de altura, aproximadamente (Figura 4).

En el tratamiento con 7.5 mg de BAP y 1.5 mg de ANA por L de medio, cinco de ocho explantes formaron órganos, tanto raíces como brotes. El diámetro de los explantes fue de alrededor de 1.5 cm. Los explantes produjeron entre uno y cinco brotes con alturas que variaron entre 0.5 y 1.2 cm.



Figura 1. Yema apical de jengibre desprendiendo brácteas. Se puede observar la formación de callo.



Figura 2. Yema apical de jengibre con brotes y raíces a los 35 días de sembrada.

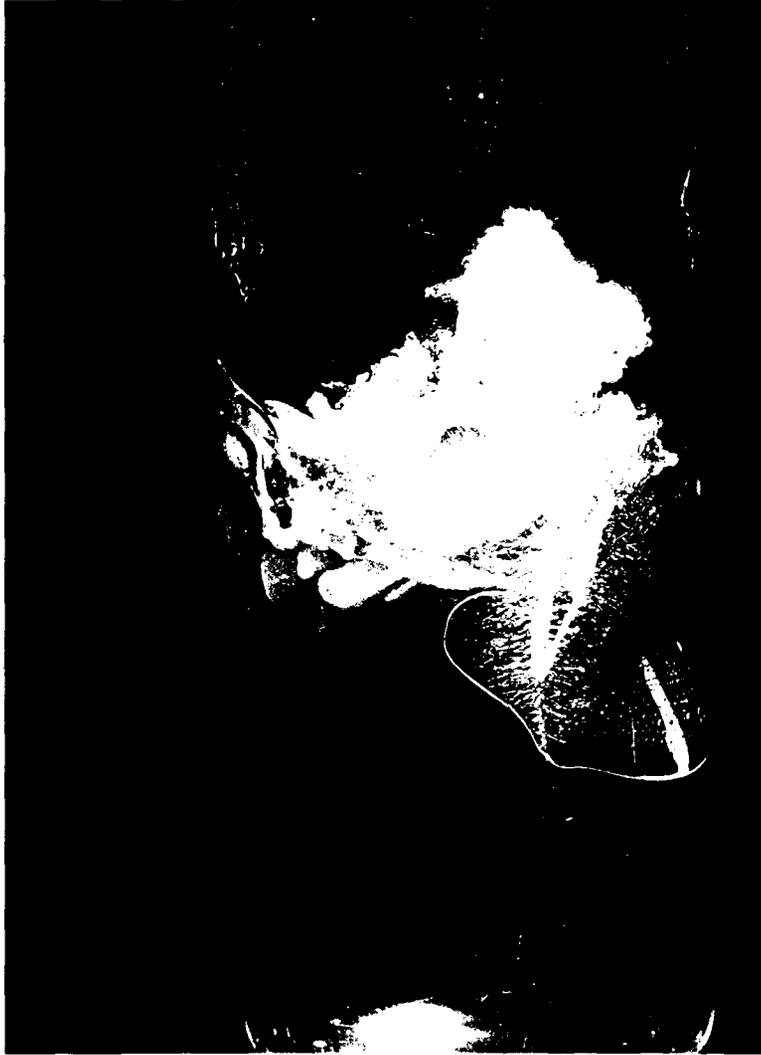


Figura 3. Yema apical de jengibre que formó brotes y raíces con 5 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de ANA, a los 68 días de siembra. Nótese que los brotes parten de yemas laterales preexistentes.



Figura 4. Yema apical de jengibre que formó brotes y raíces con 7.5 mg/l de BAP y 1mg/l de ANA, a los 68 días de siembra.

4.3 ETAPA DE MULTIPLICACIÓN

Para esta etapa se usaron 5 mg de BAP por L de medio. Los explantes sobrevivientes de la etapa de establecimiento se dividieron en tantas partes como lo permitían. Se intentó dejar un brote en cada sección, o si el callo era grande pero sin brotes se dividía en varias porciones. Luego de 15 días de transferidos al medio de multiplicación, se observó que solo crecieron los brotes que procedían de medios de establecimiento que contenían dosis de 2.5 mg de BAP y 1 mg de ANA por L de medio o mayores

Después de 45 días de transferidos, una sección proveniente del tratamiento con 2.5 mg de BAP y 1 mg de ANA por litro había crecido y se había multiplicado, tenía dos brotes de 7 cm de longitud con raíces y otra sección tenía varios brotes pequeños.

De las porciones que venían de explantes del tratamiento de 2.5 mg de BAP y 1.5 mg de ANA por litro, en dos no se observó un crecimiento de los de los brotes en esta etapa. De los cuatro restantes, únicamente tres habían producido plántulas completas a los 45. Las plántulas tenían cerca de 9 cm de altura. En promedio había cuatro brotes por tubo, todos con raíces. La porción restante respondió más tarde y a los 90 días tenía once brotes con raíces.

Las porciones que provenían del tratamiento con 5 mg de BAP y 0 de ANA por litro, una no mostró crecimiento de brotes, solo aumentó su tamaño. Llegó a medir 1 cm de diámetro, era blanca, con manchas verdes y de apariencia granular. Dos secciones formaron tres brotes cada una, con raíces que medían casi 7 cm. Las cuatro restantes respondieron más tarde y a los 90 días tenían entre uno y cuatro brotes con raíces. Las secciones que provenían del tratamiento de 5mg de BAP y 0.5 mg de ANA por litro, no proliferaron en la etapa de multiplicación. Las porciones del tratamiento con 5 mg de BAP y 1 mg de ANA por litro respondieron lentamente. Y a los 90 días habían formado plantas completas. Una sección del explante produjo dos brotes y el otro diez, todos con raíces, que midieron cerca de 9 cm de altura. Las secciones de explante del tratamiento con 5 mg de BAP y 1.5 mg de ANA por litro de medio. Formaron plantas completas y a los 45 días tenían un promedio de cuatro brotes y midieron aproximadamente 8 cm (Figura 5).

Ninguna de las dos porciones del tratamiento con 7.5 mg de BAP y 0.5 mg de ANA por litro, crecieron ni se diferenciaron.

La sección proveniente del tratamiento que contenía 7.5 mg de BAP y 1 mg de ANA por litro de medio, formó cinco brotes con raíces. Los brotes midieron alrededor de 9 cm, a los 45 días de estar en el medio de multiplicación.

Después se realizó una segunda etapa de multiplicación con los brotes y plantas que no llegaron al tamaño (3 cm) adecuado para aclimatación, en este subcultivo se observó que las porciones transferidas tenían la misma tasa de brotación que en la primera etapa de multiplicación



Figura 5. Plantulas de jengibre en multiplicación provenientes de una sección de un explante que creció en un medio con 5 mg/l de BAP y 1.5 mg/l de ANA.

4.4 ETAPA DE ACLIMATACIÓN

Se transfirieron al invernadero de aclimatación un total de 55 plantas, que tenían entre 3 y 9 cm de largo. En las más pequeñas se observó que las hojas iniciales morían poco tiempo después pero brotaban nuevas hojas. La primera semana, las plantas no crecieron, pero desde la segunda semana en adelante se observó un rápido crecimiento casi de un centímetro por semana. A las tres semanas de mantenerlas con alta humedad y temperatura, las plantas estaban en constante crecimiento y podían soportar condiciones ambientales normales (Figura 6). De las cincuenta y cinco plantas pasadas a invernadero murieron cinco (10 % de mortalidad).

300812



Figura 6. Planta de jengibre en crecimiento, luego de tres semanas de transferida al suelo en el invernáculo. Nótese que las primeras hojas formadas *in vitro* murieron

5. DISCUSIÓN

5.1 ESTABLECIMIENTO

Se observó claramente que hubo superioridad en la respuesta de los explantes con la combinación de ANA y BAP. Se sabe que cada especie requiere un balance hormonal diferente, en cuanto a cantidades y tipos de hormonas. La mayor respuesta del jengibre al ANA en este experimento y no al AIA probablemente se deba a que esta última es una auxina natural que no se acumula en grandes cantidades en las células, debido a que existen procesos naturales de inactivación y destrucción, que son menos eficientes con las auxinas sintéticas (por ejemplo ANA), lo que les permite acumularse y tener un período activo relativamente largo al aplicarlas exógenamente. Las auxinas sintéticas son más estables debido a que existen pocos sistemas enzimáticos que las ataquen fácilmente, llegando al punto de que en grandes cantidades son tóxicas (Bidwell, 1979). En cuanto a las citoquininas se sabe que las sintéticas del tipo purínico y sustituidas con un anillo de bencil (BAP, por ejemplo) son aún más activas que la misma zeatina (la citoquinina natural de mayor potencia). Son aún más activas si la cadena lateral tiene alrededor de cinco carbonos, y la actividad se incrementa por la presencia de un anillo bencénico o por insaturaciones en la cadena lateral, que es el caso del BAP. La Kin no posee el anillo bencénico, por lo que su poder citocínico es menor que el BAP (Hurtado y Merino, 1988).

Lo anterior probablemente explica la respuesta superior de los explantes en los tratamientos que contenían ANA y BAP, en comparación con los tratamientos con AIA - Kin y ANA - Kin, y una respuesta insignificante de los tratamientos con AIA - BAP pues únicamente dos tratamientos respondieron.

5.2 EXPERIMENTO DE DIFERENTES DOSIS DE ANA CON BAP

Por los resultados obtenidos, parece que el jengibre en la etapa de establecimiento, necesita de ANA y BAP, en especial de BAP en dosis altas, pues se observó una mejor respuesta en los tratamientos con 5 mg o 7.5 mg de BAP por litro de medio. Los promedios de brotación fueron mayores con estas dos concentraciones, en especial en los tratamientos con 7.5 mg de BAP por litro. Hosoki y Sagawa (1977) encontraron que la inducción de brotes por las citoquininas en jengibre es similar a lo reportado en otras monocotiledóneas, ya que se produce una ruptura de la dominancia apical permitiendo la brotación de las yemas que rodean a la apical. Parece que las yemas apicales de jengibre, al ser expuestas, a ANA y BAP y en las concentraciones experimentadas, rompen su dominancia apical, dando lugar a la brotación de las yemas laterales que las rodean,

produciéndose el inicio de la propagación masiva. Cada uno de estos brotes, al ser transferido a un medio similar sufrirá el mismo proceso de brotación, lo que permite mantener constantemente material de propagación en el laboratorio, y material para transferir a la etapa de aclimatación en invernadero. A pesar de que las yemas formaron callos, éste no estuvo relacionado con la organogénesis del jengibre. En jengibre encontramos la proliferación de brotes por medio del rompimiento de la dominancia apical en los explantes (yemas).

5.3 MULTIPLICACIÓN

Aparentemente el tratamiento anterior, aplicado en establecimiento, no influye en la cantidad de plantas obtenidas en multiplicación, pues se observó que tanto los explantes que provinieron de tratamientos con bajas concentraciones de citoquinina y auxina, como los de tratamientos con altas concentraciones respondieron bien a la alta concentración de citoquinina (5 mg de BAP por litro) usada en esta etapa. Al ser pasados los brotes al medio de multiplicación que contiene una dosis alta de BAP, se da nuevamente la ruptura de la dominancia apical, aumentando el número de brotes y permitiendo que los antiguos se desarrollen, permitiendo la transferencia constante de plantas al invernadero y continuar con la multiplicación.

5.4 ACLIMATACIÓN

Al inicio las plantas no crecieron, probablemente por que estaban reestableciendo su sistema radical, ya que las raíces formadas *in vitro* son poco funcionales, pasado cierto período las hojas iniciales murieron pero los primordios formados antes, dieron lugar a nuevas hojas inmediatamente, estas hojas ya eran fotosintéticamente activas, por esto la planta empezó a crecer normalmente, luego de un período de adaptación.

6. CONCLUSIONES

- La mejor combinación de hormonas para micropropagar jengibre es la de BAP con ANA.
- El jengibre necesita dosis de 5 mg/l 7.5 mg/l (o más altas) de BAP para su establecimiento *in vitro*.
- El jengibre responde a una dosis de 5 mg/l en la etapa de multiplicación.
- No es necesaria la etapa de enraizamiento en jengibre pues enraiza en multiplicación.
- El jengibre se adapta satisfactoriamente a una aclimatación con alta temperatura y alta humedad relativa en el invernáculo.

7. RECOMENDACIONES

- Utilizar explantes procedentes de plantas previamente tratadas con fungicidas y bactericidas.
- Utilizar explantes que provengan de rizomas con poco tiempo de almacenados.
- Realizar pruebas de rendimiento en el campo, comparando plantaciones de plantas procedentes de cultivo *in vitro* , contra plantaciones hechas con semilla comercial.
- Hacer un estudio económico comparativo entre plantaciones sembradas con rizomas de semilla comercial contra plantaciones hechas con plantas propagadas *in vitro*.

8. BIBLIOGRAFÍA

- BIDWELL, M. 1979. Reguladores de crecimiento vegetal. In Fisiología Vegetal: México. D.F., Editorial AGT. p. 32-56.
- CHEN-HAN, J.; JIMÉNEZ, C. 1994. Propagación clonal in vitro de jengibre rojo (*Alpinia purpurata*). In Propagación clonal in vitro de diferentes especies vegetales en el laboratorio del INA. Instituto Nacional de Aprendizaje. Departamento Técnico Docente Agropecuario Granja Modelo. Misión Técnica Agrícola de la República China. San José. Costa Rica. p. 16-21.
- EL SALVADOR, FUNDACIÓN SALVADOREÑA PARA EL DESARROLLO ECONÓMICO Y SOCIAL. 1994. Perfil del jengibre. San Salvador, El Salvador. 12 p.
- FUNEZ, S. s.f. Maneja bien tu semilla y asegurarás el éxito de tu producción de jengibre. Fundación Hondureña de Investigación Agrícola. La Lima. Honduras. 3 p.
- HOSOKI, T.; SAGAWA, Y. 1977. Clonal Propagation of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) through tissue culture. *HortScience* (EE.UU.) 12(5): 451-452.
- HURTADO, D. V.; MERINO, M. E. 1988. Cultivo de tejidos vegetales México D.F., Editorial Trillas. p. 48-127
- KRIKORIAN, A. 1982. Propagación clonal in vitro. In Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Ed. por William Roca y Luis Mroginski. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali Colombia, CIAT. p. 96-112.
- LEÓN, J. 1987. Zingiberáceas. In Botánica de cultivos tropicales. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José. Costa Rica, IICA. p. 99-100.
- MALAMUG, J.; INDEN, H.; ASAHIRA, T. 1991. Plantled regeneration and propagation from ginger callus. *Scientia Horticulturae* (Netherlands) 48: 89-97.
- MAISTRE, J. 1989. Las plantas de especias. Barcelona. España, Blume p.18-55.

- MOREL, G. 1964. Tissue culture. A new means of clonal propagation of orchids. *Bulletin American Orchid Society* 33: 472-478.
- MURASHIGUE, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Annual review of plant physiology (EE.UU.)* 25: 135-166.
- MURASHIGUE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum (EE.UU.)* 15: 473-497.
- NAVARRO, S. 1988. Cultivo de meristemas. *In Cultivo de tejidos vegetales*. Ed. por Daniel Hurtado y María Merino. México D.F., Trillas. p. 134-146.
- PIERIK, R. L. M. 1990.. Traspaso desde el medio nutritivo al suelo. *In Cultivo in vitro de plantas superiores*. Madrid, España, Mundi Prensa. p. 127-133.
- RAMÍREZ, T. 1996. Cultivo de jengibre para exportación. Fundación Hondureña de Investigación Agrícola. FHIA. La Lima. Honduras. 12 p.
- SOLANO, X. 1991. Jengibre. *In Aspectos técnicos sobre cuarenta y cinco cultivos agrícolas de Costa Rica* Dirección General de Investigación y Extensión Agrícola. San José, Costa Rica. p. 463-466.
- STYER, D.; CHIN, C. 1983. Meristem and shoot tip culture for propagation, pathogen elimination, and germplasm preservation. *Horticultural Reviews (EE:UU.)* 5: 221-277.
- ZELAYA, L. 1997. Propagación *in vitro* de Zingiberáceas. Tesis Ing. Agr. Zamorano, Honduras. 39 p.