

NOTA TÉCNICA

VASO FERMENTADOR DE BAJO COSTO PARA LA MICROPROPAGACIÓN MASIVA DE JENGIBRE¹

Alejandro Hernández-Soto², Andrés Gatica-Arias³, Silvana Alvarenga-Venutolo⁴

RESUMEN

Vaso fermentador de bajo costo para la micropropagación masiva de jengibre. La presente investigación se realizó en el Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica, durante el primer semestre del 2003 y tuvo como objetivo desarrollar un vaso fermentador de bajo costo para la micropropagación masiva de jengibre. El vaso fermentador propuesto en este trabajo tuvo un costo aproximado de \$4 USD, con capacidad de utilizar de 50 a 75 brotes como material de partida en 350 ml de medio de cultivo líquido. Cada brote inicial generó alrededor de $2,9 \pm 1,4$ brotes, con una altura de $3,1 \pm 0,1$ cm, un peso fresco de $1,2 \pm 0,5$ g y un peso seco de $0,24 \pm 0,27$ por brote.

Palabras clave: Bioreactor, *Zingiber officinale*, medio líquido, cultivo *in vitro*, hiperhidricidad.

ABSTRACT

Low cost glass fermentor design for mass micropropagation of ginger. We developed a low cost glass fermenting devise for massive micro-propagation of ginger in the Biotechnology Research Center of Instituto Tecnológico de Costa Rica, during the first semester of 2003. The fermenting devise is an efficient, low cost system (approximated \$4 USD), that uses 350 ml of liquid media, and it is able to propagate between 50 to 75 explants, each one producing $2,9 \pm 1,4$ buds, with an average height of 3.1 ± 0.1 cm, fresh weight of 1.2 ± 0.5 g and dry weight of 0.24 ± 0.27 g.

Keywords: Bioreactor, *Zingiber officinale*, liquid medium, *in vitro* culture, hyperhydricity.



INTRODUCCIÓN

El jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) es una planta herbácea perenne cultivada en la India, África, Jamaica, Indonesia, Australia, China y Japón (Jiménez y Murillo 2004). En Costa Rica, se cultiva en todo el país, principalmente en la zona Huetar Norte y Atlántica. En el año 2005 se exportó un total 861,97 toneladas métricas con un valor de 737 840 US\$ (CNP 2007).

El jengibre se utiliza para dar sabor a los alimentos y como ingrediente importante en repostería, en la elaboración de bebidas gaseosas y en la perfumería (Ross 2001). En la medicina tradicional se emplea el rizoma (fresco, seco, en polvo, en tintura, en jarabe, en infusión) preparado como tónico estomacal, contra la artritis, el reumatismo, intoxicaciones, asma, bronquitis, catarro, fiebre, tos, gripe, inflamación de la garganta, amigdalitis y pulmonía (Rodríguez 2000). Desde el

¹ Recibido: 19 de febrero, 2007. Aceptado: 18 de enero, 2008. Proyecto de Investigación Estudiantil financiado por la Vicerectoría de Investigación Instituto Tecnológico de Costa Rica.

² Autor para correspondencia: Correo electrónico: alejandro.hernandez.s@gmail.com. Servicio Fitosanitario del Estado, Ministerio de Agricultura y Ganadería, San José, Costa Rica.

³ Laboratorio de Biotecnología y Transformación Genética de Plantas, Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, 2060 San Pedro, Costa Rica.

⁴ Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica.

punto de vista nutricional, la ingesta de jengibre aporta buenas cantidades de hierro, calcio, fósforo y las vitaminas riboflavina y niacina (Jiménez y Murillo 2004).

La principal forma de propagación del jengibre es por rizomas (Sharma y Singh 1995). Este método tradicional de propagación implica que gran parte de la cosecha debe almacenarse para ser utilizada como semilla en la siguiente siembra, y presenta diversos problemas. Entre los problemas asociados están: baja tasa de multiplicación (10-15 brotes laterales por rizoma después de seis meses), mezcla de variedades, así como diseminación de enfermedades y plagas de una cosecha a otra. Este último, inclusive durante el almacenamiento de la semilla (Sharma y Singh 1995, Sharma y Singh 1997, Shirgurkar *et al.* 2001).

La problemática descrita anteriormente plantea la necesidad de recurrir a técnicas de propagación no convencionales que permitan obtener plantas y rizomas libres de enfermedades con altas tasas de multiplicación (Sharma y Singh 1995, Sharma y Singh 1997). La propagación clonal *in vitro* de jengibre ha sido descrita por varios investigadores (Hosoki y Sogawa 1977, Bhagyalaskhmi y Singh 1988, Babu *et al.* 1991 citados por Sharma y Singh 1995, Malamug *et al.* 1991 citados por Sharma y Singh 1995, Kackar *et al.* 1993 citados por Sharma y Singh 1995, Sharma y Singh 1997). A pesar de que el cultivo de tejidos tradicional ofrece solución a los problemas anteriormente mencionados, su costo es elevado por la alta cantidad de mano de obra que requiere y a su escasa automatización (Preil 1991), aspectos que limitan su transferencia al pequeño productor.

En los últimos años se han planteado nuevas estrategias para el desarrollo de métodos innovadores de propagación que permitan superar las limitaciones inherentes a la micropropagación. En muchos países se realizan esfuerzos para la aplicación de tecnologías que incrementen el volumen de vitroplantas, disminuir el costo y aumentar la eficiencia. Entre ellas se encuentran los bioreactores, jarras fermentadoras, sistemas de inmersión temporal y erlenmeyer en agitación y reposo (Etienne y Berthouly 2002).

Los vasos fermentadores se definen como sistemas de cultivo con un flujo de aire inyectado al sistema y un volumen aproximado de 10 litros de medio

líquido (Akita y Takayama 1994). El medio líquido en vaso fermentador posee ventajas con respecto a la micropropagación en medio semisólido, como son: no requiere de grandes volúmenes de medio de cultivo, se produce mayor cantidad de plántulas, no requiere subcultivos frecuentes, ni de gran cantidad de recipientes de cultivo, la aireación estimula la tasa de crecimiento celular y, por lo tanto la biomasa aumenta a menor costo debido, entre otros factores, a que no se necesita gelificantes (Jiménez *et al.* 1999, Etienne y Berthouly 2002, ZIV 2005).

Se ha documentado la propagación masiva de vitroplantas de papa (*Solanum tuberosum*) (Alvarenga 2001), azuzena (*Lilium* spp), gladiola (*Gladiolus grandiflorum*), fresa (*Fragaria ananasa*), clavel (*Dianthus caryophyllus*), y piña (*Ananas comosus*) (Ziv 2000); así como la producción *in vitro* de microtubérculos de papa empleando vasos o jarras fermentadoras (Akita y Takayama 1994). Sin embargo, a la fecha, no se ha reportado el uso de vasos fermentadores para la propagación masiva del jengibre. Por lo tanto, la presente investigación tuvo como objetivo diseñar y evaluar un vaso fermentador de bajo costo para la micropropagación a gran escala de jengibre (*Z. officinale* Roscoe). La implementación del mismo permitiría obtener plántulas élite a bajo costo y libres de contaminantes (bacterias y hongos) lo que aseguraría la alta calidad de material accesible al pequeño agricultor. Dentro de las limitaciones de la investigación están la necesidad de evaluar la respuesta del material en invernadero o campo debido a razones económicas y de tiempo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de crecimiento

El presente trabajo se realizó durante el primer semestre del 2003 en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago. Se utilizaron plantas *in vitro* de jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), las cuales fueron donadas por el Laboratorio de Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede de San Carlos, Costa Rica. Los brotes de las plantas *in vitro* de 3 a 5 cm de longitud se cultivaron cada cinco semanas en el medio de cultivo de multiplicación descrito por

Matarrita (1989), el cual consiste de las sales minerales del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) complementadas con 3 mg/l de bencilaminopurina (BAP), 1 mg/l de ácido naftalenacético (ANA), 30 g/l de sacarosa y 1,8 g/l Phytigel; el pH se ajustó a 5,7 antes de autoclavar el medio de cultivo por 21 minutos a 115 lb/ pulg² de presión y a 121° C. El medio de cultivo se modificó con 100 mg/l de caseína hidrolizada. Se cultivaron dos brotes por frasco Gerber con 20 ml de medio de cultivo. Los mismos se colocaron en el cuarto de crecimiento a una temperatura de 24±2° C con un fotoperíodo de 16 horas luz.

Diseño de los vasos fermentadores

Se diseñaron cuatro modelos de vasos fermentadores con base en un recipiente de vidrio de cuatro litros de capacidad y todos ellos con dos filtros millipore de 0,2 µm en la parte superior, uno para la entrada de aire y otro para la salida de gases. Para la provisión de aire y la oxigenación del medio de cultivo se utilizó un motor eléctrico funcionando permanentemente. La variación entre los modelos utilizados consistió en el tipo de aglomerante empleado: sin soporte (modelo simple), rejilla de polipropileno (modelo rejilla), espuma de algodón (modelo espuma) y piedras de material inerte de 1 cm de largo y 3 mm de ancho (modelo piedras inertes).

En cada vaso fermentador se cultivaron 50 brotes de jengibre con 400 ml de medio de multiplicación en estado líquido. Como testigo se cultivaron 50 brotes de jengibre en frascos Gerber con 20 ml de medio de multiplicación en estado semisólido.

Análisis estadístico

Transcurridas cinco semanas de cultivo, en cada uno de los tratamientos se determinó el número de brotes, tamaño, el peso fresco y seco de las plántulas regeneradas *in vitro*. Los datos se analizaron mediante ANOVA y las diferencias entre las medias de los tratamientos se contrastaron mediante la prueba Tukey HSD ($P < 0,05$). Para el análisis se utilizó el programa estadístico Statistix 1.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A la quinta semana de cultivo, los brotes de jengibre cultivados en el medio de multiplicación en estado semisólido y en el modelo de piedras inertes, regeneraron y formaron una vitroplanta con alrededor de tres a cuatro nuevos brotes (Figura 1A). Inicialmente las vitroplantas mostraron clorosis, por lo que se decidió añadir al medio de cultivo caseína hidrolizada como una fuente adicional de nitrógeno.

El medio de cultivo líquido ofrece una serie de ventajas en comparación con la micropropagación en medio semisólido. Sin embargo, una de las limitantes es la hiperhidricidad. En este fenómeno, se presenta un desarrollo anormal de las plantas, que conlleva a un pobre desarrollo, caracterizado por plantas frágiles de apariencia vidriosa, con hojas suculentas y un escaso sistema apical y radical. Además, las hojas se caracterizan por poseer un mesófilo desorganizado, un parénquima esponjoso con grandes espacios intercelulares, tejido vascular deforme, epidermis anormal que carece de cutícula funcional y células guardas que no responden a los estímulos luminosos (Debergh 1992, Ziv 2000). Inicialmente se utilizó un vaso fermentador con medio líquido, una entrada de aire estéril y sin soporte, lo que resultó en la muerte total de los explantes debido a la hiperhidricidad.

Debido a lo anterior, se decidió utilizar distintos soportes: un modelo simple sin soporte, un soporte de rejilla y uno de espuma, al cabo de cinco semanas, en todos se obtuvieron vitroplantas traslúcidas y cloróticas, con pocos o ningún brote, de baja altura y peso seco disminuido o menor en comparación con el control, (Figura 1B, Figura 1C y Figura D, Cuadro 1). El poco crecimiento y la clorosis de los brotes de jengibre observado en estos tres primeros modelos, se puede atribuir a la hiperhidricidad, debido al constante contacto del explante con el medio de líquido, a la falta de oxígeno (Teisson y Alvard 1994) o bien a la escasa luminosidad debida a la obstrucción de la luz por la tapa del recipiente. Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Alvarenga (2001) en papa, quien atribuye el pobre desarrollo de las vitroplantas a la falta de oxígeno en el medio de cultivo. Los soportes utilizados, como espuma y una rejilla de polipropileno, no disminuyeron



Figura 1. Características morfológicas de los explantes de jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) cultivados en: A. Medio de multiplicación en estado semisólido. B. Modelo simple. C. Modelo de la rejilla. D. Modelo de la espuma. E. Modelo de las piedras inertes. Cartago, Costa Rica. 2003.

Cuadro 1. Número y altura de brotes desarrollados en los modelos de vaso fermentador utilizados en la multiplicación de jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). Cartago, Costa Rica. 2003.

Tratamiento	Número de brotes	Altura de los brotes (cm)
Control	3,1±1,3 a	3,2±0,8 a
Modelo simple	1,8±1,0 b	2,0±0,9 b
Modelo rejilla	0,0±0,0 c	0,0±0,0 c
Modelo espuma	0,0±0,0 c	0,0±0,0 c
Modelo piedras inertes	2,9±1,4 a	3,1±0,1 a

Datos seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes para la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).

la hiperhidricidad y por lo tanto se consideran modelos inapropiados para la producción *in vitro* de jengibre.

Por último, se implementó un modelo con un soporte de piedras inertes, el cual permitió el crecimiento vigoroso y formación de brotes y raíces de los explantes (Figura 1E). El número de brotes y altura de los explantes es similar al del control (Cuadro 1), mientras que el

peso seco fue significativamente mayor en comparación con el control (Cuadro 2).

Cuadro 2. Peso fresco y seco de los brotes desarrollados en los modelos de vaso fermentador utilizados en la multiplicación de jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). Cartago, Costa Rica. 2003.

Tratamiento	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
Control	1,4±0,5 a	0,16±0,15 b
Modelo simple	0,8±0,4 b	0,07±0,02 c
Modelo rejilla	0,3±0,2 c	0,03±0,02 c
Modelo espuma	0,3±0,1 c	0,01±0,01 d
Modelo piedras inertes	1,2±0,5 a	0,24±0,27 a

Datos seguidos por la misma letra no son estadísticamente diferentes para la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).

El modelo de piedras inertes para la micropropagación de jengibre permitió que los explantes no estén en constante contacto con el medio de cultivo en estado líquido por lo que se disminuyen los problemas asociados con la hiperhidricidad. El mayor peso seco con respecto

a los explantes cultivados en medio de multiplicación en estado semisólido, se puede atribuir a una mejor conversión de los nutrientes en componentes estructurales de la planta, debido a un mayor intercambio gaseoso y más facilidad de absorción de los nutrientes y reguladores de crecimiento del medio líquido (Ziv 2005).

En comparación con los explantes propagados en medio semisólido, el modelo de piedras inertes presentó ciertas ventajas: se puede cultivar un mayor número de explantes con una menor cantidad de medio líquido (de 50 a 75 explantes por 350 ml de medio), se disminuyó el costo debido a la ausencia de gelificante y a la reducción de mano de obra. Además, los explantes tuvieron la posibilidad de alcanzar una mayor altura debido al mayor tamaño e intercambio gaseoso del recipiente del vaso fermentador en comparación con los envases convencionales de menor tamaño.

CONCLUSIONES

En la presente investigación se desarrolló una metodología para la micropropagación a gran escala de *Z. officinale*, Roscoe en un vaso fermentador de bajo costo. Cada vaso fermentador tuvo un costo aproximado de 4 \$USD. Esto se puede comparar con otros sistemas de producción a gran escala, como los sistemas de inmersión temporal, que tienen un valor aproximado de 32 \$USD cada uno. Asimismo, el equipo necesario para la instalación de un sistema de inmersión temporal tiene un valor aproximado de 65 \$USD, más el costo del compresor de aire y la instalación eléctrica. Mientras que para el funcionamiento del vaso fermentador diseñado en la presente investigación, sólo se requiere un motor eléctrico, con un valor de 6 \$USD y es útil para al menos cuatro vasos fermentadores. Lo atractivo del sistema que se propone, para la propagación masiva de jengibre, radica en la disminución de costos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica, por el financiamiento de la presente investigación estudiantil.

LITERATURA CITADA

- Aguilar, E. s.a. Guía del cultivo de jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) (en línea). San José, C.R. Consultado 14 set. 2003. Disponible en: <http://www.infoagro.go.cr/tecnologia/tuberculos/gengibre.htm>
- Alvarenga, S. 2001. Micropropagación masiva, mercadeo e industrialización de papa (*Solanum tuberosum* L.). Observaciones de proyecto de investigación. Centro de Investigación en Biotecnología. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica.
- Akita, M; Takayama, S. 1994. Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L). tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control. *Plant Cell Reports* 13: 184-187.
- Babu, K; Samasudeen, K; Ratnambal, M. 1992. *In vitro* plant regeneration from leaf derived callus in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 29: 71-74.
- Bhagyalakshmi, N; Singh N. 1988. Meristem culture and micropropagation of a variety of ginger (*Zingiber officinale* roscoe) with a yield of oleorisin. *Journal of Horticultural Science (India)* 63: 321-327.
- CNP (Consejo Nacional de Producción). 2002. Servicio de información de mercadeo (en línea). San José, C.R. Consultado 14 set. 2003. Disponible en: http://www.mercanet.cnp.go.cr/SIM/Frutas_y_Vegetales/Estimaciones/RyT_ResumenProdAnual.htm
- Deberg, A; Cohen, D; Von Arnold, Z; Ziv, M. 1992. Reconsideration of the term "vitrification" as used in micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 30: 135-140.
- Etienne, H; Berthouly, M. 2002. Temporary immersion system in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 69: 215-231.
- Hosoki, T; Sagawa Y. 1977. Clonal propagation of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) through tissue culture. *Horticulturae Science (EEUU)* 12: 451-452.
- Jiménez, E; Pérez, N; De Fera, M; Barbón, R; Capote, A; Chavéz, M; Quiala, E; Pérez, J. 1999. Improved

- production of potatoe microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 59: 19-23.
- Jiménez, V; Murillo, O. 2004. Información nutricional sobre el jengibre. Consejo Nacional de Producción, Dirección Mercadeo y Agroindustria. San José, Costa Rica. Consultado 1 ene. 2004. Disponible en: http://www.mercanet.cnp.go.cr/Desarrollo_Agroid/documentospdf/Jengibre_FTN.pdf
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plantarum* 15: 473-497.
- Preil, W. 1991. Application of bioreactors in plant propagation. *In: Debergh, PC; Zimmerman, RH. eds. Micropropagation.* p. 425-445.
- Rodríguez, H. 2000. Utilidad de las plantas medicinales. Heredia, Costa Rica. EUNED. 213 p.
- Ross, I. 2001. Medicinal plants of the world: Chemical constituents, traditional and modern medicinal uses. Humana Press. New York.
- Rout, GR; Palai, SK.; Samantaray, S; Das, P. 2001. Effects of growth regulators and culture conditions on shoot multiplication and rhizome formation in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) *in vitro*. *In vitro cell developmental biology-plant* 37: 814- 819.
- Sharma, TR; Singh, BM. 1995. *In vitro* microrhizome production in *Zingiber officinale* Roscoe. *Plant Cell Reports* 15: 274-277.
- Sharma, TR; Singh, BM. 1997. High- frequency *in vitro* multiplication of disease- free *Zingiber officinale* Rosc. *Plant Cell Reports* 17: 68-72.
- Shirgurkar, M; John, CK; Nadgauda, R. 2001. Factors affecting *in vitro* microrhizome production in turmeric. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 64: 5-11.
- Teisson, C; Alvard, D. 1994. A new concept of plant *in vitro* cultivation in liquid medium: Temporary immersion. VIII th Int. Congress of plant tissue and cell tissue. Firenze, Italy. p. S2-2.
- Villalobos, J; Cárdenas, F. 2002. Lista de enfermedades de los cultivos agrícolas de Costa Rica (en línea). Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, C.R. Consultado 14 set. 2003. Disponible en: <http://www.protecnet.go.cr/diagnosticofitosanitario/enferme/LISTA%20ENFERMEDADES%20ACTUALIZADA.htm>
- Ziv, M. 2000. Bioreactor technology for plant micropropagation. *Horticultural Reviews*. 24:1-30. Consultado 25 abril 2002. Disponible en: http://www.josseybass.com/Corporate/Website/Objects/Product/CDA/PDF_Item/1,8789,219_45%7CC00%7C0,00.pdf
- Ziv, M. 2005. Simple bioreactors for mass propagation of plants. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 81: 277-285.