

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**PROPAGACION CLONAL IN VITRO DE  
ALPINIA PURPURATA K. Schum  
(Gengibre rojo)**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa Conjunto de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de la Universidad de Costa Rica y el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar al grado de

Magister Scientiae

Por

Aracelis Morón

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA  
Departamento de Producción Vegetal  
Turrialba, Costa Rica  
1987

## DEDICATORIA

A Omar Torrijos y a Panamá,  
por la identidad que me inspiraron.

Al Dr. Rodrigo Tarté,  
porque admiro su espíritu de trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

La autora desea manifestar su agradecimiento a las siguientes personas e instituciones:

A Luis De Urriola por su apoyo, comprensión y generosidad.

A los compañeros de IDIAP que me apoyaron durante los difíciles momentos de las gestiones previas a mi llegada a Turrialba: Ing. Rubén D. Reyes, Dr. Enrique Andrade, Ing. Gonzalo Gonzalez, Lic. Berta Pérez y Lic. Miguel Cuellar.

A la Lic. Nélide Ayala, funcionaria de IFARHU, que sin conocerme tuvo fe en mi desde el principio.

Al Ing. Oscar Madrigal por facilitarme el material vegetal durante las pruebas preliminares.

Al Dr. Ludwig Müller, profesor consejero, por su constante apoyo y colaboración durante la realización de esta investigación. Además por facilitarme todo el equipo disponible del Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

Al Dr. Oscar Arias por el interés demostrado y sus valiosas enseñanzas.

Al Dr. Ramón Lastra y Dr. Rutilio Quezada, miembros del comité asesor y al Dr. Victor Villalobos por sus aportes a este trabajo.

Al Dr. Pedro Ferreira por su orientación en los aspectos de diseño y análisis estadísticos.

Al Ing. Marc Berthouly y Dr. Asha Ram por su desinteresada colaboración en el fotografiado del material experimental.

Al Ing. Jorge Sandoval e Ing. Alberto Berrios por sus oportunas sugerencias.

Al Ing. Valentín Jimenez, a Miguel Pardo y Carlos Jimenez por sus enseñanzas en el uso de la microcomputadora.

A los compañeros del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y PROMECAFE por su amistad.

Al gobierno de Holanda, IDIAP y a CATIE por financiar mis estudios de posgrado.

## BIOGRAFIA

La autora nació en mayo de 1955 en la ciudad de La Habana, Cuba.

En 1961 su familia emigró a la República Argentina. Allí finalizó sus estudios primarios, cursó los secundarios y universitarios. En 1972 se graduó de Perito Mercantil Nacional como egresada del colegio Martín Zapata de la ciudad de Mendoza. En 1974 optó por la nacionalidad argentina. En 1981 recibió su diploma de Ingeniera Agrónoma otorgado por la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Cuyo.

Durante la etapa final de sus estudios de agronomía trabajó para la Consultora Urbanística Arancibia, a cargo del diseño de las áreas verdes en los proyectos de urbanización.

En 1982 se estableció en Panamá. Su primera experiencia de trabajo en la región tropical fue con la entidad gubernamental Corporación para el Desarrollo del Bayano. Estuvo a cargo de la ejecución de programas agrícolas destinados a los indígenas Kunas y Chocoes del Alto Bayano que

habían sido trasladados con motivo de la construcción de la represa hidroeléctrica Bayano.

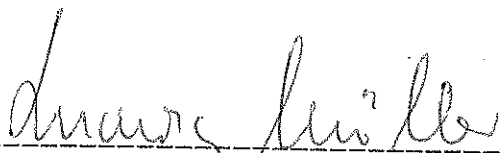
Durante 1983 pasó a ejercer funciones al Instituto de Investigaciones Agropecuarias de Panamá (IDIAP). En esta institución se desempeñó como responsable del proyecto de investigación agronómica e industrial del pixbae (Bactris gassipaes).

En abril de 1985 ingresó al programa de posgrado de la Universidad de Costa Rica- Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (UCR-CATIE) en Turrialba, para realizar estudios de maestría en el Departamento de Producción Vegetal, área de cultivo de tejidos.

Esta tesis ha sido aceptada en su forma presente por la Comisión de Estudios de Posgrado del Programa Conjunto UCR-CATIE como requisito parcial para optar al grado de

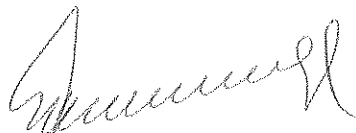
Magister Scientiae

COMITE ASESOR



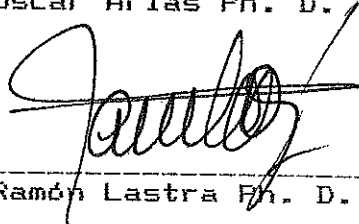
-----  
Ludwig Müller Ph. D.

Profesor Consejero



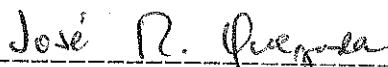
-----  
Oscar Arias Ph. D.

Miembro del Comité



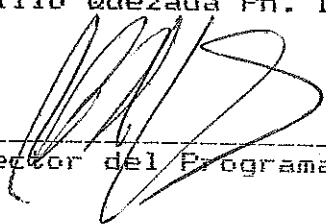
-----  
Ramón Lastra Ph. D.

Miembro del Comité



-----  
Rutilio Quezada Ph. D.

Miembro del Comité



-----  
Director del Programa de Estudios de Posgrado



-----  
Decano Sistema de Estudios de Posgrado



-----  
María de Aracelis Morón, Candidata

## INDICE

	Página
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
BIOGRAFIA.....	v
COMITE ASESOR.....	vii
INDICE.....	viii
RESUMEN.....	xi
SUMMARY.....	xiii
LISTA DE CUADROS.....	xv
LISTA DE FIGURAS.....	xviii
1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION DE LITERATURA.....	5
2.1. Generalidades.....	5
2.2. Propagación clonal <u>in vitro</u> .....	7
2.2.1 Ventajas.....	8
2.2.2 Desventajas.....	9
2.3. Etapas de la propagación clonal <u>in vitro</u> ....	11
2.3.1. Etapa 0:Selección y preparación de la planta madre.....	11
2.3.2. Etapa I:Establecimiento del cultivo a- séptico.....	12
2.3.3. Etapa II:Multiplicación.....	13
2.3.4. Etapa III:Enraizamiento.....	13
2.3.5. Etapa IV:Aclimatación o endurecimiento..	14
2.4. Propagación por inducción de brotes axilares	15
2.5. Importancia de los reguladores de crecimen- to.....	17
2.6. Variación somaclonal.....	16
2.7. Aplicación del cultivo de tejidos a especies ornamentales.....	19
2.7.1. Costos de producción.....	20
2.7.2. Certificación.....	21
2.7.3. Patentes en biotecnologías de plantas..	21
2.8. Micropropagación de plantas para flor.....	22
2.9. Antecedentes de cultivo <u>in vitro</u> en el orden	



Zingiberales.....	22
3. MATERIALES Y METODOS.....	26
3.1. Localización del experimento.....	26
3.2. Material vegetal.....	26
3.2.1. Manejo y desinfección.....	27
3.2.2. Inoculación del explante desinfectado..	29
3.2.3. Condiciones de crecimiento.....	30
3.3. Medios de cultivo.....	30
3.4. Etapas del cultivo <u>in vitro</u> de <u>Alpinia</u> <u>purpurata</u> .....	33
3.4.1. Etapa I:Establecimiento aséptico del explante.....	33
3.4.2. Etapa II:Inducción de brotes.....	35
3.4.2.1. Cultivo.....	35
3.4.2.2. Subcultivo.....	38
3.4.2.3. Subcultivo con Altas Dosis de Citocinina.....	40
3.4.3. Etapa III:Enraizamiento.....	41
3.4.3.1.Enraizamiento <u>in vitro</u> .....	41
3.4.3.2.Enraizamiento <u>in vivo</u> .....	42
3.4.4. Etapa IV:Aclimatación.....	43
3.5. Análisis de datos.....	44
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	45
4.1. Etapa I.....	45
4.1.1. Supervivencia y contaminación.....	45
4.1.2. Respuesta al tratamiento hormonal ini- cial.....	48
4.1.3. Oxidación.....	48
4.2. Etapa II.....	49
4.2.1. Cultivo.....	49
4.2.1.1. Análisis estadístico.....	51
4.2.1.1.1. Influencia de la Etapa I durante la proliferación de brotes.....	51
4.2.1.1.2. Respuesta a los trata- mientos hormonales de multiplicación.....	52
4.2.2. Subcultivo.....	54
4.2.2.1. Análisis estadístico.....	56
4.2.2.1.1. Influencia del trata- miento hormonal inicial durante la Etapa II.....	56
4.2.2.1.2. Respuesta a los trata- mientos de multiplicación.....	56
4.2.3. Subcultivo con altas dosis de citocini- nas.....	61
4.2.3.1. Análisis estadísticos.....	61
4.2.3.1.1. Influencia del trata- miento hormonal previo al experimento.....	62
4.2.3.1.2. Respuesta a los trata- mientos de multiplicación.....	62

4.3. Etapa III.....	66
4.3.1. Enraizamiento <u>in vitro</u> .....	66
4.3.2. Enraizamiento <u>in vivo</u> .....	68
4.4. Etapa IV.....	69
4.5. Plantas aberrantes.....	69
5. CONCLUSIONES.....	71
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	74
7. APENDICE.....	79
8. GLOSARIO.....	90

MORON, A. 1987. Propagación clonal in vitro de Alpinia purpurata K. Schum (gingibre rojo). Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R., Programa Universidad de Costa Rica/CATIE. 97 p.

Palabras claves: Alpinia purpurata, propagación in vitro.

### RESUMEN

El gingibre rojo (Alpinia purpurata K. Schum) es una zingiberácea que tiene un alto valor, en el mercado internacional, como planta ornamental y como flor cortada. La especie es originaria del Pacífico Sur y está ambientada a la zona húmeda de Centroamérica y el Caribe. Sin embargo, en esta región no produce semilla por lo que la propagación debe hacerse vegetativamente.

La metodología del cultivo in vitro tiene como principal ventaja la gran capacidad de multiplicación a partir de un fragmento de tejido de la planta madre seleccionada.

La presente investigación se realizó entre setiembre de 1985 y enero de 1987, en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del CATIE, Turrialba, Costa Rica. Los objetivos fueron: 1- el establecimiento in vitro de ápices vegetativos, 2- lograr la multiplicación clonal rápida in vitro, 3- determinar la mejor relación auxina/citocinina para una rápida proliferación de brotes y raíces y 4- conocer los requerimientos de la especie para el traspaso del estado in vitro a in vivo.

Se utilizaron ápices provenientes de rizomas y de bulbillos florales. Los medios utilizados se fundamentaron en el medio basal de Murashige y Skoog (MS). En la fase de establecimiento se usó 4,33 g/l de sales comerciales (MS), sacarosa al tres por ciento, 100 mg/l de cisteína-HCl, 5 ml/l de vitaminas (MS), 7 g/l de Bacto-agar Difco y 1, 2 o 3 mg/l de bencilaminopurina (BA). En la fase de multiplicación se suprimió la cisteína, se usó el medio básico (MS) más sacarosa al tres por ciento, 1,5 g/l de Gelrite y 0, 2, 4, u 8 mg/l de BA y 0, 0,5 o 1 mg/l de ácido naftalenacético (NAA). Se probaron todas las combinaciones de concentraciones de ambos tipos de reguladores de crecimiento. Para el enraizamiento in vitro se disminuyó la concentración de sales (MS) a la mitad. Se ensayaron las

combinaciones de las siguientes concentraciones 0, 2 o 4 mg/l de NAA y 0, 0,5 o 1 mg/l de BA. Para el enraizamiento in vivo se sumergieron los cultivos en una solución de 40 mg/l de NAA durante 24 horas. La aclimatación de las plántulas se realizó en macetas con suelo estéril colocadas en cámaras de nebulización.

Los porcentajes de supervivencia obtenidos del total de explantes cultivados en la fase de establecimiento variaron con el tipo de desinfección. El mejor resultado fue de 73 por ciento de supervivencia lo que se logró con hipoclorito de sodio como desinfectante e inoculando el mismo día. Los tejidos del gengibre rojo no mostraron oxidación.

Para la proliferación de brotes el mejor tratamiento fue el de 2 mg/l de BA sin NAA. Se determinó que el NAA causa un efecto detrimental en la formación de brotes como así también dosis de BA superiores a los 10 mg/l.

El enraizamiento in vivo en cámaras de nebulización resultó el método más rápido y económico de preparar los cultivos a las condiciones de vida libre.

La tasa de multiplicación lograda en el laboratorio con 2 mg/l de BA fue de 5,47 en cinco meses, mientras que la obtenida en el invernadero sin tratamientos de inducción de brotes fue de 5 en 10 meses. Es decir que en el invernadero se obtuvo aproximadamente la misma cantidad de nuevos ápices vegetativos en el doble de tiempo. Estas tasas indican que la especie en estudio respondió favorablemente a la propagación clonal in vitro.

MORON, A. 1987. In vitro clonal propagation of Alpinia purpurata K. Schum (red ginger). Master of Science Thesis, Turrialba, C.R. University of Costa Rica/CATIE Program. 97 p.

Key Words: Alpinia purpurata, propagation in vitro.

#### SUMMARY

The red ginger (Alpinia purpurata K.Schum) is a zingiberaceae that is highly esteemed in international markets as an ornamental plant or as a cut flower. The species is originally from the South Pacific area and is adapted to the humid regions of Central America and the Caribbean. Since at the region it does not produce seeds, it has to be propagated vegetatively.

The principal advantage of cultivating red ginger in vitro is its great capacity for multiplication beginning, with a fragment of tissue from a selected mother plant.

The present research was carried out between September 1985 and January 1987 in the Tissue Culture Laboratory of CATIE in Turrialba, Costa Rica. The objectives were: 1- to define the conditions for establishing shoot tips in vitro, 2- to achieve rapid clonal multiplication in vitro, 3- to determine the best ratio auxin/cytokinin for rapid shoot and root proliferation and 4- to establish the requirements of the species for transfer from the in vitro to the in vivo condition.

The shoot tips used came from rhizomes and floral bulbils. The media used were based on the basal medium of Murashige and Skoog (MS). In the establishment phase, 4.33 g/l of commercial (MS) salts, three per cent sucrose, 100 mg/l cysteine-HCl, 5 ml/l of (MS) vitamins, 7 g/l of Difco Bacto-agar and 1, 2 or 3 mg/l of benzylaminopurine (BA) were used. The cysteine was eliminated in the multiplication phase, using the basic (MS) medium plus three per cent sucrose, 1.5 g/l of Gelrite and 0, 2, 4 or 8 mg/l of BA and 0, 0.5 or 1 mg/l of naphthalene acetic acid (NAA). All the combinations of concentrations of both types of growth regulators were tried. For rooting in vitro, the concentration of (MS) salts was reduced to one half. Combinations of 0, 2 or 4 mg/l of NAA and 0, 0.5 or 1 mg/l of BA were tested. For rooting in vivo the cultures were

immersed in a solution containing 40 mg/l of NAA for 24 hours. The hardening of the plantlets was done in pots with sterilized soil placed in mist chambers.

The survival percentage obtained for all explants in the establishment phase varied according to the type of disinfection. The best result was 73 per cent survival and obtained by using sodium hypochlorite as the disinfectant and inoculating the same day. The tissue of red ginger did not cause any oxidation problems.

Two mg/l of BA without NAA was the best treatment for shoot proliferation. It was found that NAA had a detrimental effect on shoot formation, as well as doses of BA exceeding 10 mg/l.

Rooting in vivo in mist chambers resulted in the most rapid and economic method for preparing the cultures for natural conditions.

The multiplication rate achieved in the laboratory was 5.47 in five months using 2 mg/l of BA, while that obtained in the greenhouse without treatments for shoot induction was 5 for the double period of time. These rates show that the species studied responded adequately to clonal propagation in vitro.

## LISTA DE CUADROS

## En el texto

Cuadro		Página
1	Importaciones mundiales de plantas, flores y follaje expresadas en millones de dólares.....	1
2	Porcentaje de laboratorios comerciales de Estados Unidos y resto del mundo y cultivos producidos.....	20
3	Especies del orden Zingiberales propagadas <u>in vitro</u> .....	24
4	Tratamientos de desinfección del explante primario.....	28
5	Composición del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS).....	32
6	Diseño de los bloques durante el establecimiento aséptico del explante.....	34
7	Diseño de los bloques durante el Cultivo en etapa II.....	37
8	Resumen de las cantidades de los reguladores de crecimiento utilizados en el cultivo <u>in vitro</u> de <u>Alpinia purpurata</u> .....	39
9	Prueba de Duncan para los tratamientos de desinfección.....	47
10	Pruebas t de Student para las medias de brotes a los 30 días de etapa II, según la permanencia del cultivo en etapa I.	51

## En el apéndice

## Cuadro

1A.	Análisis de varianza del porcentaje de supervivencia a los 30 días de cultivo en etapa I de <u>Alpinia purpurata</u> .....	80
-----	--	----

2A.	Análisis de varianza para el número de brotes a los 30 y 60 días de cultivo en etapa de multiplicación de <u>Alpinia purpurata</u> .....	81
3A.	Análisis de varianza para el número de brotes a los 30 y 60 días de subcultivo de <u>Alpinia purpurata</u> .....	82
4A.	Análisis de varianza del número de brotes a los 30 y 60 días de subcultivo con altas dosis de citocininas en <u>Alpinia purpurata</u> .....	83
5A.	Promedio de brotes formados durante el cultivo en etapa II considerando el tratamiento hormonal inicial al que estuvieron sometidos.....	84
6A.	Promedio de brotes formados durante el cultivo en etapa II considerando la relación BA/NAA en mg/l a la que estuvieron sometidos por 30 días.....	84
7A.	Promedio de brotes formados durante el cultivo en etapa II considerando la relación BA/NAA en mg/l a la que estuvieron sometidos por 60 días.....	84
8A.	Promedio de brotes formados durante el cultivo en etapa II para cada nivel de BA en estudio.....	85
9A.	Promedio de brotes formados durante el cultivo en etapa II considerando el nivel de auxina al que estuvieron sometidos.....	85
10A.	Promedio de brotes formados durante el subcultivo considerando el tratamiento hormonal inicial al que estuvieron sometidos.....	86
11A.	Promedio de brotes formados durante el subcultivo considerando la relación BA/NAA en mg/l a la que estuvieron sometidos por 30 días.....	86
12A.	Promedio de brotes formados durante el subcultivo considerando la relación BA/NAA en mg/l a la que estuvieron sometidos.....	



	dos por 60 días.....	86
13A.	Promedio de brotes formados durante el subcultivo para cada nivel de BA en estudio.....	87
14A.	Promedio de brotes formados durante el subcultivo considerando el nivel de auxina al que estuvieron sometidos.....	87
15A.	Promedio de brotes formados durante el subcultivo con altas dosis de citocinina en etapa II considerando el tratamiento hormonal inicial al que estuvieron sometidos por 60 días.....	88
16A.	Promedio de brotes formados durante el subcultivo con altas dosis de citocinina en etapa II, considerando la relación BA/NAA en mg/l a la que estuvieron sometidos.....	88
17A.	Promedio de brotes formados durante el subcultivo con altas dosis de citocinina en etapa II, para cada nivel de BA en estudio.....	89
18A.	Promedio de brotes formados, durante el subcultivo con altas dosis de citocinina en etapa II, considerando el nivel de auxina a que estuvieron sometidos.....	89

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Supervivencia y contaminación en cada tratamiento de desinfección expresadas en porcentaje del total de yemas de rizomas cultivadas, en la fase de establecimiento del <u>Alpinia purpurata</u>	46
2	Efecto de tres dosis iniciales de BA en la formación de brotes de <u>Alpinia purpurata</u> a los 30 y 60 días de la etapa de multiplicación del experimento Cultivo.....	53
3	Respuesta a cuatro dosis de BA utilizadas para la inducción de brotes de <u>Alpinia purpurata</u> , a los 30 y 60 días de la etapa de multiplicación del experimento Cultivo.....	55
4	Efecto de tres dosis iniciales de BA en la formación de brotes de <u>Alpinia purpurata</u> a los 30 y 60 días de la etapa de multiplicación del experimento Subcultivo.....	57
5	Respuesta a cuatro dosis de BA utilizadas para la inducción de brotes de <u>Alpinia purpurata</u> a los 30 y 60 días de la etapa de multiplicación del experimento Subcultivo.....	59
6	Efecto de tres concentraciones de NAA utilizadas en los tratamientos (citocinina/auxina) para la inducción de brotes, de <u>Alpinia purpurata</u> en el experimento Subcultivo.....	60
7	Influencia de tres tratamientos hormonales anteriores, en la formación de brotes de <u>Alpinia purpurata</u> a los 30 y 60 días del experimento Subcultivo con Altas Dosis de Citocininas.....	63
8	Efecto de las tres concentraciones de NAA utilizadas en los tratamientos (citocinina/auxina) para la inducción	

	de brotes de <u>Alpinia purpurata</u> en el experimento Subcultivo con Altas Dosis de Citocininas.....	64
9	Efecto de altas dosis de BA en la inducción de brotes de <u>Alpinia purpurata</u>	65
10	Respuesta a seis tratamientos de inducción de brotes en <u>Alpinia purpurata</u> con altas dosis de BA.	67