Revista Internacional de Investigación e Innovación Tecnológica

Página principal: www.riiit.com.mx

Cultivo de tejidos vegetales, una alternativa para la producción de Cúrcuma *(Curcuma spp.)*

Plant tissue culture, an alternative for the production of Turmeric (*Curcuma spp.)*

Castro-González, C.G., Robles-De la Torre, R.R., Robles-López, M.R.*

Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Carretera Estatal Santa Inés Tecuexcomac-Tepetitla, km 1.5, Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala C.P. 90700, México.
ccastrog2001@alumno.ipn.mx; rdelator@ipn.mx; mrobles@ipn.mx*

Innovación tecnológica: Producción continua del Cúrcuma.

El área de aplicación industrial: Biotecnología alimentaria y biotecnología vegetal, aplicada en el área agroindustrial.

Recibido: 25 enero 2024
Aceptado: 11 julio 2024

Abstract

The *Curcuma* genus has more than 100 species of the *Zingiberaceae* family, and an ancestral history whose use as a condiment and medicine in India is millennia old. Currently, the rhizome maintains great commercial importance in the pharmaceutical, nutraceutical and cosmetics industries. Curcuminoids have been identified in their molecular composition, to which medicinal properties are attributed: anti-inflammatory, lipid-lowering, antioxidants, among others.

The conventional cultivation of this plant is annual and is carried out by sowing the rhizomes, which limits the sale of 100% of those harvested**,** since it is necessary to conserve a part for the next sowing, where losses are generated due to commensals such as insects and rodents, as well as development of microorganisms. *In vitro* culture techniques have been used as an alternative to produce this genus in order to have plants available all year round and avoid preserving part of the rhizomes. The present review aims to provide information on micropropagation through tissue culture of curcuma species as an alternative to the disadvantages of conventional production of *Curcuma spp.*

Key words: *Curcuma* spp., Micropropagation, Plant tissue culture, Medicinal plants, In vitro culture.

Resumen

El género *Curcuma* tiene más de 100 especies de la familia *Zingiberaceae*, y una historia ancestral cuyo uso como condimento y medicinal en la India es milenario, actualmente el rizoma, mantiene una gran importancia comercial en la industria farmacéutica, nutraceútica y cosmética. En su composición molecular se han identificado curcuminoides, a los cuales se le atribuyen propiedades medicinales como: antinflamatorias, hipolipemiantes, antioxidantes, entre otras.

El cultivo convencional de esta planta es anual y se realiza sembrando los rizomas, lo que limita la venta del 100% de los cosechados ya que se requiere conservar una parte para la siguiente siembra, donde se generan mermas a causa de comensales como insectos y roedores, así como desarrollo de microrganismos. Las técnicas de cultivo *in vitro* se han utilizado como una alternativa de producción de este género para poder así tener plantas disponibles todo el año y evitar conservar parte de los rizomas. La presente revisión tiene como objetivo proporcionar información sobre la micropropagación a través del cultivo de tejidos de especies de cúrcuma cómo una alternativa frente a las desventajas de la producción convencional de *Curcuma spp.*

Palabras clave: Cultivo *in vitro, Curcuma* spp., Micropropagación, Plantas medicinales.

Introducción

La medicina tradicional mundial incluye un gran número de especies vegetales que son usadas de diversas formas para mejorar la salud, o prevenir enfermedades, sus usos se han transmitido de generación en generación. Actualmente se desarrollan muchas investigaciones para demostrar los beneficios brindados por esas plantas, así como el estudio de los compuestos bioquímicos a los que se les atribuyen los efectos benéficos, un caso particular de dichas plantas es la cúrcuma (*Curcuma longa* spp.).

La cúrcuma es considerada una especia por su sabor, olor y la capacidad tintórea que se difunde en los alimentos, pero también es una planta medicinal de importancia económica que se cultiva sobre todo en los países del sudeste asiático [1]. Existen numerosos artículos que describen que el rizoma de cúrcuma es rico en compuestos fitoquímicos como alcaloides, flavonoides, curcuminoides, taninos y terpenoides, la extracción y caracterización de los compuestos bioactivos con propiedades medicinales puede brindar una amplia gama de oportunidades de su uso en diversas industrias como la farmacéutica, alimentaria y cosmética [2,3].

La producción hortícola de cúrcuma se ve afectada por muchos factores, principalmente la lenta tasa de propagación, además de las enfermedades transmitidas por el suelo, el deterioro de los rizomas causado por bacterias y los ataques de hongos e insectos (Figura 1), de aquí que es necesario incrementar su producción para poder disponer de los beneficios nutracéuticos de este rizoma.



Figura 1. Signos de pudrición provocada por la contaminación de microorganismos en rizomas de cúrcuma.
Imagen propia.

Para aprovechar los beneficios de esta importante planta se requieren sistemas eficientes de propagación y regeneración que involucren técnicas de biotecnología vegetal tales como el cultivo de tejidos vegetales (CTV). Esto facilitaría la producción hortícola a mayor escala, el posible mejoramiento genético tradicional, y la estimulación para lograr un incremento en la producción de metabolitos de interés farmacéutico (Figura 2), ya que la productividad anual de cúrcuma también es afectada por la latencia del rizoma, la escasa floración y la esterilidad de sus flores [4,5].



Figura 2. Cúrcuma usada como medicina.
Imagen propia.

Algunos autores mencionan que, aunque la producción de cúrcuma es a través de rizomas, su tasa de multiplicación es muy baja [6]. Además, Sinchana et al., en 2020 [7], reportan que solo se producen de 10 a 15 yemas laterales en una temporada de crecimiento, a partir de un solo rizoma y una parte de esta cosecha se conserva como material semilla para la siguiente temporada de producción (entre el 20 y 25 %).

En la revisión de Bandara et al., en 2021 [8], se enlistan algunas razones involucradas en el bajo rendimiento y calidad en la producción de cúrcuma, tales como: la lenta tasa de multiplicación o regeneración, la alta susceptibilidad a las enfermedades fúngicas, bacterianas y por nematodos. Sobre todo, se enfatiza la baja producción de semillas debido a que muy rara vez producen floración.

Para hacer un mejor uso de esta planta por sus diversas aplicaciones, se requieren sistemas eficientes de propagación y regeneración que involucren alternativas como cultivo de tejidos, con lo que se facilita la propagación hortícola a mayor escala.

Beneficios farmacéuticos de *Curcuma longa* spp.

Numerosos estudios relacionados con el conocimiento ancestral del género *Curcuma*, han demostrado la acción preventiva sobre muchas enfermedades como el cáncer y enfermedades cardiovasculares [9]. En el caso particular de esta especie, se ha demostrado el efecto contra enfermedades gastrointestinales, especialmente para trastornos biliares y hepáticos, reumatismo, inflamación, sinusitis, anorexia, tos, y efectos hipolipidémico y anticoagulante [10].

Los principales responsables de las propiedades antes mencionadas son los *curcuminoides*, que son compuestos químicos cuya base es la curcumina (C), y dos de sus principales derivados: demetoxicurcumina (DMC) y bis-demetoxicurcumina (BDMC), estos tres curcuminoides junto con otros componentes imparten el distintivo color amarillo de esta planta [11], además de las vitaminas como betaína, vitamina A y C, colato y colina y minerales como calcio, fósforo, hierro, zinc, magnesio, potasio y sodio [12].

Ventajas del CTV en la reproducción de especies

Actualmente las aplicaciones de los Cultivos de Tejidos Vegetales (CTV) tienen diferentes propósitos, por ejemplo, para la producción de plantas libres de enfermedades, la multiplicación rápida de genotipos vegetales escasos o en peligro de extinción, la transformación del genoma vegetal para la producción de metabolitos derivados de plantas de importante valor comercial, entre otras notables ventajas sobre las prácticas convencionales de propagación hortícola, los CTV logran facilitar la producción de grandes cantidades de plantas homogéneas durante todo el año, los que los hace en muchos casos indispensables y único camino [14,15].

La micropropagación es el proceso *in vitro* de regeneración de una planta completa utilizando estados totipotentes o pluripotentes y de autorrenovación de la célula, los tejidos se mantienen en condiciones ambientales favorables similares de las condiciones *in vivo*. Los explantes de tejidos y órganos (que pueden ser hojas, tallos, raíces y meristemos), se cultivan en un recipiente cerrado utilizando medios de cultivo preestablecidos en condiciones controladas y asépticas [16].

Durante el desarrollo de la micropropagación de plantas, se han diseñado un gran número de protocolos para la micropropagación de plantas de importancia medicinal y comercial, como piña (*Ananas comosus*) [17], estevia (*Stevia rebaudiana)* [18] y moringa (*Moringa oleifera)* [19]. Sin embargo, los esfuerzos recientes de micropropagación se han dirigido notablemente a la conservación de plantas medicinales, con especial énfasis en especies utilizadas cómo medicinas tradicionales, sobre todo en países como China y la India [20–22].

La regeneración de plantas puede lograrse mediante dos rutas principales: i) la organogénesis o por ii) embriogénesis somática [23]. La organogénesis es un proceso de formación de órganos vegetales a partir de una sección de una planta (explante), siendo posible obtener plantas con características similares a la donante [24,25].



Figura 3. Fotografías de organogénesis directa obtenida de cúrcuma.
Fotografías propias.

La embriogénesis somática es una vía de desarrollo celular vegetal *in vitro* que se utiliza principalmente para la propagación clonal. Aquí, las células o tejidos somáticos se diferencian en embriones que posteriormente se convierten en plantas; este proceso se logra a través de un medio de cultivo sintético que permite el crecimiento y la posterior diferenciación celular con el uso de fitohormonas y diferentes tipos de sales que funcionan cómo nutrientes. En este proceso se forma una masa de células desorganizadas (callos), que posteriormente con el uso de otras sales y fitohormonas se va transformando en masas de células diferenciadas y organizadas para dar pie a un número mayor de plantas que las que se pudieran obtener en la organogénesis directa [23].

Tanto la organogénesis cómo la embriogénesis somática son procesos utilizados con diferentes fines, que van desde la obtención de un número mayor de plantas en menor tiempo o bien para producir compuestos bioactivos a gran escala.

Avances en el cultivo *in vitro* de *Curcuma longa* spp.

Existe una amplia diversidad de trabajos en los cuales, utilizando las técnicas de cultivo de tejidos se busca obtener una alta producción de cúrcuma, tal es el caso del trabajo de Monsalve Fonnegra et al., en 2014 [26] cuyo objetivo fue obtener una gran cantidad de plantas con las características fitosanitarias y de estabilidad genética para su comercialización. Marchant et al., 2021 [27] publicaron en un trabajo con objetivos similares utilizaron herramientas cómo los sistemas de inmersión temporal (SIT). Este tipo de propagación *in vitro*, tiene algunas ventajas como: obtener una mayor tasa de multiplicación, mejorar el desarrollo de raíces *in vitro* y sobre todo en un espacio reducido.

En algunos casos el objetivo es producir callos celulares para posteriormente tener un mayor número de metabolitos secundarios y así utilizarlos con diversos fines [6,28]. Para poder lograrlo, el primer paso es desarrollar un protocolo eficiente de asepsia del tejido que dará origen a las células, este pude ser una hoja, un tallo o una semilla y así iniciar con el siguiente paso, la micropropagación en medios de cultivo específicos para generar el crecimiento de células que generaran callos celulares (tejido amorfo). Kaewthip et al., en 2021 [29] lograron desarrollar un protocolo efectivo para la asepsia de explantes el cual inicia sumergiendo brotes del rizoma de cúrcuma en una solución de alcohol al 70% durante cinco minutos, seguido de un lavado con una solución de Cloruro de Mercurio ($HgCl_2$) al 0.10% durante 10 minutos. Por otro lado Sinchana et al., 2020 [7], expusieron los primeros brotes provenientes de rizomas de cúrcuma a diferentes concentraciones de $HgCl_2$, obteniendo contaminación máxima de 16% con hongos y un 13% de bacterias utilizando como mejor concentración la del 0.10% de $HgCl_2$ durante 15 minutos, estos autores también lograron estandarizar durante dos años, el protocolo para la eficiente micropropagación y enraizamiento de esta misma especie.

Tabla 1. Agentes químicos desinfectantes utilizados en la etapa de establecimiento *in vitro* de *curcuma* spp.

Especie	Agente químico utilizado	Explantes utilizados	Referencia bibliográfica
Curcuma zedoaria Roscoe	Hipoclorito de sodio al 2% en agitación 10 min, 3 lavados con agua destilada estéril.	Brotes y yemas jóvenes	[30]
Curcuma longa Linn	Etanol al 70% (v/v) por 30 s, Hipoclorito de sodio comercial al 20% (v/v) por 20 min y 4 enjuagues agua destilada estéril.	Yemas de rizoma	[31]
Curcuma zedoaria	Agua bidestilada estéril seguido de $HgCl_2$ al 0,1% por 3 a 4 min., enjuague con agua estéril.	Yemas axilares	[32]
Curcuma longa Linn (variedad suguna)	Detergente líquido comercial al 5% v/v, enjuague con etanol al 70% por 30 s y por 3 min en $HgCl_2$ al 0,1%. estreptomicina al 0,1% 1 min y lavado varias veces en agua bidestilada.	Yemas vegetativas no embriogénicas	[33]
Curcuma longa Linn	Captan 2 g/l, alcohol 70% por 30s, hipoclorito de sodio, 5,25% de ingrediente activo con 3 gotas de tween 20 por 20 min, 3 enjuagues de agua destilada.	Brotes aéreos y yemas del rizoma	[34]
Curcuma caesia	$NaHClO_3$ al 15% por 5 min, etanol al 70 % 30 s, HgCl2 al 0,1% por 5 min, 4 enjuagues con agua bidestilada.	Brotes de rizoma y hojas	[35]

Desde nuestra experiencia, el establecer de manera aséptica tejidos provenientes de yemas de rizoma, resulta ser el mejor explante para lograr obtener cultivos libres de microorganismos. Además, hemos comprobado que es fundamental incluir en los lavados de los explantes, etanol al 70% (v/v) durante 30 s, ya que la mayoría de los autores lo propone en los protocolos desarrollados. Y de nuestra experiencia, el lavar con fungicida y bactericida durante 30 minutos el tejido a establecer previa a la desinfestación en campana, ayuda a eliminar esporas ó bactetias presentes en los rizomas que provienen de sustratos no estériles.

Una vez lograda la etapa de establecimiento *in vitro* de cúrcuma, es necesario utilizar reguladores de desarrollo para lograr incrementar la producción. Se ha micropropagado *Curcuma caesia y Curcuma zedoaria* utilizando explantes de yemas de rizoma [36]. La mejor respuesta para la multiplicación de brotes la obtuvieron en medio basal MS [37] suplementado con 4 mg L^{-1} BAP (Bencilaminopurina) y 1,5 mg L^{-1} NAA (ácido 1-naftalenacético para *C. caesia* (3,5 ± 0,79 brotes por explante) y 1 mg l^{-1}BAP + 0,5 mg l^{-1} NAA para *C. zedoaria* (4,5 ± 0,15 brotes por explante).

Otros autores, justifican que el uso de la CTV, así como la aplicación de la biotecnología en la agricultura, es más prometedora que otros métodos de propagación convencionales. Por ello, se han enfocado en desarrollar protocolos completos que llevan una rastreabilidad de producción de cada uno de los subcultivos establecidos *in vitro* de *Curcuma longa* L. Tal es el caso del artículo publicado por Hefni et al., en 2018 [38], que sirve como guía para las empresas que buscan incrementar su rendimiento productivo utilizando las técnicas de CTV.

Sin embargo, todos los protocolos generados en el área de CTV con el objetivo de producir especies, pueden irse mejorando y cada grupo de trabajo busca

obtener los rendimientos más altos de producción generando diferentes combinaciones de variables que permita obtener el mayor número de plantas por explante. Gurav et al., en 2020 [6], evaluaron los efectos de los diferentes medios nutritivos que se utilizan el CTV y el uso de fitohormonas, bajaron las concentraciones de sacarosa como fuente de carbono, para poder obtener la mayor cantidad de plantas producidas. Esto es sólo un ejemplo más de que hay mucho trabajo por hacer en el desarrollo de protocolos que permitan la replicación de estos, en cualquier laboratorio dedicado a la producción de *Curcuma longa* [6].

Aclimatación de *cúrcuma* proveniente de cultivos *in vitro*

La aclimatación (la última etapa de la micropropagación), es un paso delicado en el proceso, que requiere cuidados especiales, debido a que ocurre una transición de condiciones heterótrofas (*in vitro*) a condiciones autótrofas que requiere de una rápida adaptación y activación de factores para la supervivencia de las plántulas *ex vitro* [39]. La transferencia de plántulas *in vitro* a las condiciones *ex vitro* y finalmente al campo debe mantenerse cuidadosamente debido a los cambios en las condiciones ambientales y también para cuidar la morfología de las plántulas, particularmente en los estomas y la cutícula [40]. [41] Mencionan que el proceso de aclimatación de las plántulas de *Curcuma caesia* Roxb obtenidas de cultivos *in vitro,* lo realizaron en macetas después de la etapa de enraizamiento, en dónde seleccionaron plántulas sanas con al menos dos hojas, de más de 5 cm de longitud, con raíces de más de 1.5 cm de longitud. Dichos autores aclimataron en tres diferentes combinaciones de sustrato el cual consistió en una combinación de turba de coco, perlita y vermiculita con turba, la turba de coco produjo significativamente el mayor porcentaje de supervivencia de plántulas, con 77,78%, seguida de perlita (61,11%) y vermiculita (44,43%) después de dos semanas de aclimatación. El mayor porcentaje de supervivencia de las plántulas lo encontraron sembrando en la combinación de turba de coco y turba. En nuestra experiencia trabajando con esta especie, el mejor método de aclimatación consiste en lavar las plántulas provenientes de cultivos *in vitro,* eliminar todo el medio de cultivo que pueda encontrarse en las raíces, posteriormente sumergir las plantas completas en fungicida (Benomil®) y bactericida (Curamicyn®) a una concentración de 1 gL^{-1}. Una vez realizado esto, las plántulas se siembran en contenedores plásticos con tapa, en un sustrato compuesto por peat moss y agrolita 3 como se puede observar en la figura 4. Finalmente se cierran perfectamente con clean pack plástico y transcurridos 30 días, el clean pack se va retirando poco a poco cada día durante una semana.



Figura 4. Plantas de *Cúrcuma* en proceso de aclimatación.
Imagen propia.

Conclusiones

A pesar de que existe un gran número de referencias que reportan el uso de las técnicas CTV en la producción de *Curcuma longa*, cada laboratorio enfocado en micropropagación, tiene diferentes objetivos y problemas relacionados a la contaminación y condiciones especiales de cada subespecie, por lo que se aplican diferentes metodologías que van acorde al plan de trabajo, lo cual hace necesario estudiar los protocolos establecidos, los objetivos buscados y lograr hacer más eficientes para incrementar la producción de esta planta, sin perder de vista las concentraciones de los principios activos, con lo que se podría generar un nicho de oportunidad para la producción de extractos, encapsulados y otros productos de interés nutraceútico y culinario, favoreciendo además a la producción primaria.

Referencias

1. Chusreeaeom, K., & Khamsuk, O. (2019). "Effects of gamma irradiation on lipid peroxidation, survival and growth of turmeric *in vitro* culture". In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1285, No. 1, p. 012003). IOP Publishing. DOI:10.1088/1742-6596/1285/1/012003.

2. Anoop, K. (2015). "*Curcuma aromatica* salisb: A multifaceted spice". *International journal of phytopharmacy research*, *6*(1), 10-15.

3. Kanase, V., & Khan, F. A. R. H. A. (2018). "An overview of medicinal value of Curcuma species". *Asian J. Pharm. Clin. Res*, *11*(2), 40-45.

4. Nayak, S. (2000). "*In vitro* multiplication and microrhizome induction in *Curcuma aromatica* Salisb". *Plant Growth Regulation*, *32*(1), 41-47. DOI: https://doi.org/10.1023/A:1006307316393

5. Shirgurkar, M. V., John, C. K., & Nadgauda, R. S. (2001). "Factors affecting *in vitro* microrhizome production in turmeric". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *64*, 5-11. DOI: https://doi.org/10.1023/A:1010645624618

6. Gurav, S. S., Gurav, N. S., Patil, A. T., & Duragkar, N. J. (2020). "Effect of explant source, culture media, and growth regulators on callogenesis and expression of secondary metabolites of *Curcuma longa*". *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, *26*(2), 172-190. DOI: https://doi.org/10.1080/10496475.2019.1689542.

7. Sinchana NS, Kattimani KN, Prabhuling G, Sudesh K, Jagadeesha N. (2020). "Standardization of tissue culture protocol for turmeric (*Curcuma longa* L.) cv. Salem". *Int J Chem Stud.* 2020;8(1):2721-6. DOI: https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i1ao.8681.

8. Bandara, M. M. N. T., Dahanayake, N., Subasinghe, S., & Perera, P. C. D. (2021). "A review on *in vitro* propagation of turmeric (*Curcuma longa* Ln.)". *Journal of the University of Ruhuna*, *9*(1), 39-46. DOI:http://doi.org/10.4038/jur.v9i1.7975

9. Allegra, A., Innao, V., Russo, S., Gerace, D., Alonci, A., & Musolino, C. (2017). "Anticancer activity of curcumin and its analogues: preclinical and clinical studies". *Cancer investigation*, *35*(1), 1.DOI:https://doi.org/10.1080/07357907.2016.1247166.

10. Abdel-Lateef, E., Mahmoud, F., Hammam, O., El-Ahwany, E., El-Wakil, E., Kandil, S., ... & Hassenein, H. (2016). "Bioactive chemical constituents of *Curcuma longa* L. rhizomes extract inhibit the growth of human hepatoma cell line

(HepG2)". *Acta Pharmaceutica*, *66*(3), 387-398.

11. Jayaprakasha, G. K., Jagan Mohan Rao, L., & Sakariah, K. K. (2002). "Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin". *Journal of agricultural and food chemistry*, *50*(13), 3668-3672. DOI:https://doi.org/10.1021/jf025506a.

12. Yadav, R. P., & Tarun, G. (2017). "Versatility of turmeric: A review the golden spice of life". *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *6*(1), 41-46.

13. Umar, N. M., Parumasivam, T., Aminu, N., & Toh, S. M. (2020). "Phytochemical and pharmacological properties of *Curcuma aromatica* Salisb (wild turmeric)". *Journal of applied pharmaceutical science*, *10*(10), 180-194.

14. Altpeter, F., Springer, N. M., Bartley, L. E., Blechl, A. E., Brutnell, T. P., Citovsky, V., ... & Stewart Jr, C. N. (2016). "Advancing crop transformation in the era of genome editing". *The Plant Cell*, *28*(7), 1510-1520.

15. Debnath, M., Malik, C. P., & Bisen, P. S. (2006). "Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines". *Current pharmaceutical biotechnology*, *7*(1), 33-49.

16. Brijesh, H., & Ajjappala, B. (2023). "Micropropagation strategies in medicinally important turmeric (*Curcuma* sp): Current research and future challenges". *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, *11*(3), 1-8. DOI: 10.7324/JABB.2023.65814.

17. Sani, L. A., Usman, I. S., Nasir, A. U., & Abdulmalik, M. M. (2020). "Micropropagation of pineapple (*Ananas comosus* L. Var. Smooth cayenne) in temporary immersion bioreactor system (TIPS)". *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, *12*(2), 207-209. DOI: 10.4314/bajopas.v12i2.29.

18. Castro-González, C. G., Sánchez-Segura, L., Gómez-Merino, F. C., & Bello-Bello, J. J. (2019). "Exposure of stevia (S*tevia rebaudiana* B.) to silver nanoparticles in vitro: Transport and accumulation". *Scientific reports*, *9*(1), 10372. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-019-46828-y.

19. Jun-jie, Z., Yue-sheng, Y., Meng-fei, L., Shu-qi, L., Yi, T., Han-bin, C., & Xiao-yang, C. (2017). "An efficient micropropagation protocol for direct organogenesis from leaf explants of an economically valuable plant, drumstick (*Moringa oleifera* Lam.)". *Industrial Crops and Products*, *103*, 59-63. DOI: https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.03.028.

20. Borah, A. R., Anbumalarmathi, J., & Sharmili, S. A. (2019). "*In vitro* propagation of *Coccinia indica* (L.) Voigt. from internodal segments". *Indian Journal of Agricultural Research*, *53*(2), 202-207. DOI: 10.18805/IJARe.A-5020.

21. Hoque, A., Hossain, M., Alam, S., Arima, S., & Islam, R. (2007). "Adventitious shoot regeneration from immature embryo explant obtained from female× female *Momordica dioica". Plant Tissue Culture and Biotechnology*, *17*(1), 29-36.

22. Komal, R. (2011). "One step method of plantlet regeneration in *Trichosanthes*

dioica Roxb.: An approach towards cost effective and shorter protocol". *African Journal of Biotechnology*, *10*(1), 9-12.

23. Bhatia, S., & Bera, T. (2015). "Somatic embryogenesis and organogenesis". *Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences*, *6*, 209-230.

24. Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A., & Sugimoto, K. (2016). "Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms". *Development*, *143*(9), 1442-1451.

25. Sang, Y. L., Cheng, Z. J., & Zhang, X. S. (2018). "Plant stem cells and de novo organogenesis". *New phytologist*, *218*(4), 1334-1339. DOI: https://doi.org/10.1111/nph.15106

26. Monsalve Fonnegra, Z. I., Urrea Trujillo, A. I., & Canal Morales, A. (2014). "*Curcuma longa* L. embryogenesis and organogenesis from thin cell layers, leaf segments and bases of leaf". *Revista Colombiana de Biotecnología*, *16*(2), 74-83.

27. Marchant, M. J., Molina, P., Montecinos, M., Guzmán, L., Balada, C., Fassio, C., & Castro, M. (2021). "*In vitro* propagation of Easter Island *Curcuma longa* from rhizome explants using temporary immersion system". *Agronomy*, *11*(11), 2121. DOI: https://doi.org/10.3390/agronomy11112121

28. Soundar Raju, C., Kathiravan, K., Aslam, A., & Shajahan, A. (2013). "An efficient regeneration system via somatic embryogenesis in mango ginger (*Curcuma amada* Roxb.)". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *112*, 387-393. DOI: https://doi.org/10.1007/s11240-012-0244-4.

29. Kaewthip, W., Dheeranupattana, S., Junta, P., & Shank, L. (2021). "Sterile Tissue Preparation and Callus Induction of *Curcuma longa* Linn". CMUJ. *Nat. Sci*, *20*(3), e2021062.

30. Miachir, J. I., Romani, V. L. M., Amaral, A. F. D. C., Mello, M. O., Crocomo, O. J., & Melo, M. (2004). "Micropropagation and callogenesis of *Curcuma zedoaria* Roscoe". *Scientia Agricola*, *61*, 427-432.

31. Jie, E. Y., Ahn, M. S., Lee, J., Cheon, Y. I., Kim, C. Y., & Kim, S. W. (2019). "Establishment of a high-frequency plant regeneration system from rhizome-derived embryogenic cell-suspension cultures of *Curcuma longa* L". *Plant Biotechnology Reports*, *13*, 123-129. DOI: https://doi.org/10.1007/s11816-019-00519-2

32. Jena, S., Ray, A., Sahoo, A., Sahoo, S., Dash, B., Kar, B., & Nayak, S. (2020). "Rapid plant regeneration in industrially important *Curcuma zedoaria* revealing genetic and biochemical fidelity of the regenerants". *3 Biotech*, *10*(1), 17. DOI: https://doi.org/10.1007/s13205-019-2009-9

33. Keshamma E. "Indirect regeneration of *curcuma longa* l (variety suguna) from *in vitro* derived leaf callus". [citado 1 de diciembre de 2023]; Disponible en: http://www.acgpublishing.com/index.php/CCB/article/view/66.

34. Upendri, H. F. L., & Seranb, T. H. (2020). "Effect of explants and low cost medium on morphogenic response of aerial stem and rhizome bud explants of turmeric

(*Curcuma longa* L.) for plant regeneration". *J. Hort. Plant Res*, *1*, 15-24.

35. Abubakar, A. S., & Pudake, R. N. (2019). "Sterilization procedure and callus regeneration in black turmeric (*Curcuma caesia*)". *Agricultural Science Digest-A Research Journal*, *39*(2), 96-101.

36. Bharalee, R., Das, A., & Kalita, M. C. (2005). *In vitro* clonal propagation of *Curcuma caesia* Roxb and *Curcuma zedoaria* Rosc from rhizome bud explants. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, *14*, 61-63.

37. Murashige, T., & Skoog, F. (1962). "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures". *Physiologia plantarum*, *15*(3), 473-497.

38. Hefni, M. M., Koriesh, E. E. I., & IH, A. E. S. (2018). "Use of Biotechnology for Multiplication of *Curcuma longa* L. plant during six subcultures". *Hortscience Journal of Suez Canal University*, *7*(2), 113-119.

39. Da Silva, A. R., De Melo, N. F., & Yano-Melo, A. M. (2017). "Acclimatization of micropropagated plants of Etlingera elatior (Jack) RM Sm. Inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi". *South African Journal of Botany*, *113*, 164–169.

40. Seran, T. H. (2013). "In vitro propagation of ginger (Zingiber officinale Rosc.) through direct organogenesis: A review". *Pakistan journal of biological sciences*, *16*(24), 1826–1835.

41. Haida, Z., Sinniah, U. R., Nakasha, J. J., & Hakiman, M. (2022). "Shoot Induction, Multiplication, Rooting and Acclimatization of Black Turmeric (*Curcuma caesia* Roxb.): An Important and Endangered Curcuma Species". *Horticulturae*, *8*(8), Article 8. https://doi.org/10.3390/horticulturae8080740.