

## Micropropagación de especies hortícolas de interés comercial para Cuba. I. *Brassica oleraceae* var. *capitata* cv. Hércules y *B. rapa* L. subsp. *pekinensis* cv. Verano 6.

AMELIA CAPOTE Y J ALONSO

Instituto de investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical, INIFAT, Alejandro de Humboldt, Calle 1 y 2 Santiago de las Vegas, La Habana, Cuba.

### RESUMEN

A partir de diferentes explantos se obtuvo la inducción *in vitro* de brotes de dos especies del género *Brassica*. Los mejores resultados en repollo (*Brassica oleraceae* var. *capitata*) cv. Hércules, se lograron cuando se cultivaron las yemas axilares de plantas adultas en el medio MS suplementado con 1 mg. l<sup>-1</sup> de BAP, donde se alcanzó un alto índice de multiplicación (1:20).

Los mejores resultados en la inducción de brotes de repollo chino (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis*) cv. Verano 6, se obtuvieron al cultivar ápices provenientes de plantitas y yemas axilares de plantas adultas en el medio MS suplementado con 0,5 mg. l<sup>-1</sup> de ANA y 2 mg. l<sup>-1</sup> de BAP, lográndose 4 - 6 brotes.explanto<sup>-1</sup>.

La aplicación de esta metodología en gran escala, a nivel de "biofábricas", permite la multiplicación de estas especies de gran importancia económica para Cuba.

**Palabras clave:** *Brassica* spp., *in vitro*, repollo chino, repollo, micropropagación

## Micropropagation of horticultural species of economic interest for Cuba. I. *Brassica oleraceae* var. *capitata* cv. Hércules y *B. rapa* L. subsp. *pekinensis* cv. Verano 6.

### SUMMARY

Different explants were used for the *in vitro* induction of shoots in two *Brassica* species. In cabbage (*Brassica oleraceae* var. *capitata*) cv. Hércules the best results were achieved when axillary buds of adult plants were cultivated in MS medium with 1 mg. l<sup>-1</sup> BAP. A high index of multiplication was reached (1:20).

The best results in the induction of shoots of chinese cabbage (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis*) were obtained in a MS medium with 0,5 mg. l<sup>-1</sup> NAA and 2 mg. l<sup>-1</sup> BAP, where 4 - 6 buds.explant<sup>-1</sup> were attained.

This methodology allows the multiplication of genotypes of economic interest for Cuba at great scale ("biofactory" level).

**Keywords:** *Brassica* spp., *in vitro*, chinese cabbage, cabbage, micropropagation.

Recibido el 3 de octubre de 1996. Aceptado el 1 de abril de 1997.

## INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Brassica* ocupan un importante lugar en Cuba debido a la demanda de tales hortalizas en el mercado. El repollo (*Brassica oleraceae* var. *capitata*), es el que más se destaca con respecto al área de siembra a nivel nacional. Sin embargo, bajo las condiciones climáticas cubanas no florece y, por lo tanto, para su producción comercial se necesita de la importación anual de semillas de híbridos comerciales con un alto costo en divisas. Por otra parte, en el repollo chino (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*), se han realizado intentos con vistas a la obtención de cultivares mejor adaptados a las condiciones edafoclimáticas del país y que garanticen rendimientos más elevados.

La propagación de plantas mediante el uso de técnicas de cultivo de tejidos es, dentro de la rama de la biotecnología, una de las alternativas con mayor importancia dada su aplicación práctica para la obtención idéntica, rápida y masiva del material seleccionado (Murashige, 1990; Filippone *et al.*, 1992).

En las especies del género *Brassica* se han utilizado las técnicas de micropropagación, incluyendo, entre otras, la regeneración de brotes y su multiplicación *in vitro* (Reynolds, 1986; Leike, 1988; Zee y Johnson, 1989; Kleffer *et al.*, 1995; Parihar *et al.*, 1995).

Dada la necesidad de disminuir las importaciones de semillas de estas especies, el objetivo del presente trabajo fue establecer una metodología adecuada para la propagación acelerada de las mismas, que garantice la producción de un gran número de individuos en un corto tiempo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas de *Brassica oleraceae* var. *capitata* cv. Hércules, "repollo", y *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* cv. Verano 6, "repollo chino", fueron desinfectadas en etanol 70° por 5

min e hipoclorito de sodio 2% por 15 min, y finalmente se enjuagaron con agua destilada estéril. Luego fueron germinadas *in vitro* en un medio básico MS (Murashige y Skoog, 1962), con las sales minerales diluidas al 50% y sin suministro de reguladores vegetales.

En el repollo chino se utilizaron como explantos los ápices y en el repollo los segmentos de cotiledones, en ambos casos provenientes de plántulas de 8 a 10 días de edad. Se utilizaron, además, las yemas axilares de plantas de ambas especies desarrolladas en condiciones de campo, las cuales se lavaron con un detergente comercial y se enjuagaron con agua corriente. Posteriormente se sumergieron en etanol 70° por 5 min y en hipoclorito de sodio 5% por 20 min, para ser enjuagadas en tres oportunidades con agua destilada estéril.

Los explantos fueron cultivados en el medio MS, suplementado con 30 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa. Para la inducción de brotes a partir de los segmentos cotiledonares de repollo, el medio MS fue suplementado con 6-bencil amino purina (BAP), a razón de 1, 2 ó 3 mg. l<sup>-1</sup> y 0,1 mg. l<sup>-1</sup> de ácido naftalén acético (ANA), mientras que para las yemas axilares el medio MS fue suplementado con BAP (1, 2 ó 3 mg. l<sup>-1</sup>) sin la adición de auxinas.

Para ambos explantos de repollo chino, se utilizó el medio MS con la adición de BAP (1, 2, 4 ó 6 mg. l<sup>-1</sup>) y ANA (0,5 mg. l<sup>-1</sup>).

El pH de los medios fue ajustado a 5,8 antes de añadir el agar (7 g.l<sup>-1</sup>). Veinticinco ml de cada medio se dispuso en frascos de 100 ml de capacidad que fueron esterilizados en un autoclave a 121°C y 1,5 Kg.cm<sup>-2</sup> durante 20 min.

En todos los casos, luego de 30 días de cultivo, las hojas de los pequeños brotes conteniendo las yemas, fueron transferidas al mismo medio fresco con el objetivo de continuar su multiplicación.

Los cultivos fueron mantenidos en un fotoperíodo de 14 h y a una temperatura de 25 ± 2°C.

Se realizó el conteo del número de brotes

inducidos realizándose un análisis de varianza de las diferentes variantes y la significancia fue evaluada por medio del test de rangos múltiples de Duncan ( $P < 0,05$ ).

Para el enraizamiento de los brotes, éstos fueron cultivados en forma individual en el medio MS sin suministro hormonal. Las plántulas, previo lavado de sus raíces, fueron transplantadas para la fase de adaptación a bandejas con un sustrato constituido por zeolita: arena (1:1 v/v), hasta alcanzar una altura aproximada de 15 - 20 cm, y de ahí fueron transferidas a condiciones de campo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se puede observar en la Tabla 1, la mayor inducción de brotes ocurrió al utilizar como explantos las yemas axilares de plantas adultas de repollo, siendo muy inferior la respuesta obtenida al cultivar los segmentos cotiledonares de las plantitas germinadas *in vitro*.

Los resultados en los segmentos de coti-

**Tabla 1.** Regeneración de brotes de repollo cv. *Hércules* a partir de diferentes explantos en el medio MS suplementado con reguladores vegetales.

*Shoots regeneration of cabbage cv. Hércules from different explants in the MS medium supplemented with plant regulators.*

Tasa de multiplicación a los 30 días		
Segmentos cotiledonares	Yemas axilares	
BAP (mg. l <sup>-1</sup> )	ANA (0,1 mg.l <sup>-1</sup> )	(sin auxina)
1	2,5 ns	20 a
2	3,5 ns	15 b
3	3,0 ns	12 c

Los promedios seguidos de igual letra no difieren significativamente al 5% del test de Duncan. Means follow by the same letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's test.

ledones de repollo muestran que el mayor número de brotes. explanto<sup>-1</sup> (3,5) se obtuvo al cultivarlos en el medio MS suplementado con 2 mg. l<sup>-1</sup> de BAP y con 0,1 mg.l<sup>-1</sup> de ANA, aunque no existieron diferencias significativas con relación al resto de las concentraciones utilizadas.

George y Rao (1980) trabajando con *Brassica juncea* indicaron que la regeneración directa a partir de segmentos de cotiledones era posible, utilizando preferentemente BAP (1 mg.l<sup>-1</sup>) y ANA (1 mg.l<sup>-1</sup>) como reguladores del crecimiento. La diferencia en esta respuesta pudiera deberse a la utilización de diferentes genotipos. Sin embargo, la presencia en el medio de cultivo de estos reguladores no ha sido efectiva para la organogénesis a partir de cotiledones en otras especies del género *Brassica* (Jain *et al.*, 1988).

Cuando se utilizaron como explanto las yemas axilares de plantas adultas de repollos, cultivadas en el medio MS suplementado con 1 mg.l<sup>-1</sup> de BAP se obtuvo la mayor tasa de multiplicación (20 brotes.explanto<sup>-1</sup>), sin ser necesaria la presencia de las auxinas. Estos resultados no coinciden con los de Leike (1988), respecto a la inducción de brotes de repollo a partir de yemas axilares, ya que este autor planteó, que para su obtención fue necesaria la presencia de las auxinas (3 mg. l<sup>-1</sup> AIB) en el medio de cultivo.

Las pequeñas hojas de los brotes obtenidos, conteniendo una microyema en la axila, fueron separadas individualmente y transferidas al medio MS+ 1 mg. l<sup>-1</sup> BAP. Bajo estas condiciones cada yema produjo, en un período de 30 días, una gran cantidad de brotes adventicios (Foto 1), alcanzándose un alto índice de multiplicación (15 - 20 brotes.explanto<sup>-1</sup>).

Estos resultados fueron similares para otros cultivares de *Brassica oleraceae* var. *capitata* de introducción en el país como 1287-67 (var. *capitata* f. *rubra*) y Verano- 17 (datos no presentados).

En el caso del repollo chino la mayor inducción de brotes se obtuvo en el medio su-



**Foto 1.** Inducción de brotes de col (*Brassica oleracea* var. *capitata*) en medio MS suplementado con 1 mg. l<sup>-1</sup> BAP.

Shoots induction of cabbage in MS medium supplemented with 1 mg. l<sup>-1</sup> BAP.

plementado con 0,5 mg. l<sup>-1</sup> de ANA y 2 mg. l<sup>-1</sup> de BAP, donde se alcanzó una tasa de multiplicación de 4-6 brotes.explanto<sup>-1</sup>, siendo la respuesta similar para ambos explantos utilizados (Tabla 2). Además, se observó un ligero incremento en el número de brotes cuando se emplearon las yemas axilares de plantas adultas, al igual que lo ocurrido en el repollo.

La obtención de brotes en el repollo chino ha sido indicada con anterioridad, utilizando como explantos las yemas axilares (Kuo y Tsay, 1977) y los ápices de plantitas (Yoeup et al., 1987). Este último autor encontró los mejores resultados en medios suplementados con altas concentraciones de citocininas, en especial la cinetina, lo cual no coincide con estos resultados, donde las altas concentraciones de estos reguladores disminuyeron la inducción de brotes.

Al igual que en el repollo, estos brotes fueron utilizados a su vez como explantos, al transferirse las hojas con las yemas axilares en forma individual al mismo medio de cultivo, resultando la tasa de multiplicación similar a la obtenida en la primera fase, aumen-

**Tabla 2.** Regeneración de brotes de repollo chino cv. Verano 6 a partir de diferentes explantos en el medio MS suplementado con reguladores vegetales.

Shoots regeneration of chinese cabbage cv. Verano 6 from different explants in MS medium supplemented with plant regulators.

Tasa de multiplicación a los 30 días		
	Apices	Yemas axilares
BAP(mg. l <sup>-1</sup> )	ANA (0,5 mg.l <sup>-1</sup> )	
1	3,5 ab	4,0 b
2	4,0 a	6,0 a
4	3,0 bc	3,5 b
6	2,5 c	3,5 b

Los promedios seguidos de igual letra no difieren significativamente al 5% del test de Duncan.

Means follow by the same letter are not significantly different at the 5% level, Duncan's test.

tando con ello el número de individuos obtenidos a partir de un explanto inicial.

Tanto los brotes de repollo como del repollo chino, desarrollaron un sistema radicular adecuado, al ser cultivados en forma individual en el medio MS sin suministro de reguladores vegetales, no siendo necesaria la presencia de auxinas en el medio de cultivo, resultados que no coinciden con lo planteado para el enraizamiento de brotes en estas especies (Kuo y Tsay, 1977).

Las plántulas, una vez concluida la fase de adaptación, fueron transferidas a condiciones de campo, donde crecieron normalmente, presentando altos porcentajes de supervivencia (90-95%), manteniendo características fenotípicas similares al cultivar original (Foto 2).

Esta metodología para la inducción *in vitro* de brotes en cultivares de repollo ha sido introducida en diferentes biofábricas del país, con el objetivo de disponer de un gran número de plantas para sembrar determinadas áreas, lográndose excelentes resultados en la multiplicación de híbridos de interés, tal como ha sido indicado anteriormente para especies



Figura 2. Plantas de repollo (a) y repollo china (b) obtenidas por micropropagación crecidas en condiciones de campo.

Plants of cabbage (a) and chinese cabbage (b) obtained by micropropagation growing in field.

del género *Brassica* por Anderson y Carstens (1977).

## BIBLIOGRAFÍA

- Anderson WC and JB Carstens** (1977) Tissue culture propagation of broccoli, *Brassica oleraceae* (Italica Group), for use in F<sub>1</sub> hybrid seed production. *Journal American Society Horticultural Science* 102: 69-72.
- Filippone, E; M Leone and R Penza** (1992) Recent advances in cell and tissue culture. En: *Biotechnology: Enhancing Research on Tropical Crops in Africa*. G Thottappilly, LM Monti, DR Mohan Raj and AW Moore, Eds. CTA/IITA co-publication. IITA, Ibadan, Nigeria: 105-116.
- George L and PS Rao** (1980) *In vitro* regeneration of mustard plants (*Brassica juncea* var. RAI-5) on cotyledon explants from no-irradiated, and mutagen-treated seed. *Annals of Botany* 46: 107-112.
- Jain RK, JB Chowdhury, DR Sharma and W Flodt** (1988) Genotypic and media effects on plant regeneration from cotyledon explant cultures of some *Brassica* species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 14: 197-206.
- Kieffer M, MP Fuller and AJ Jellings** (1995) Rapid mass production of cauliflower propagules from fractionated and graded curd. *Plant Science* 107: 229-232.
- Kuo CG and JS Tsay** (1977) Propagating chinese cabbage by axillary bud culture. *Hortscience* 12: 456-457.
- Leike H** (1988) Cabbage (*Brassica oleraceae* var. *capitata* L.). En: *Biotechnology in agriculture and forestry. Vol 6 Crops II*. YPS Bajaj, Ed. Springer-Verlag, Berlin: 226-251.
- Murashige T and F Skoog** (1962) A revised medium of rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Murashige T** (1990) Plant propagation by tissue culture. A practice with unrealized potential. En: *Handbook of Plant Cell Culture*. PV Ammirato, DA Evans, WR Sharp and YPS Bajaj, Eds. McGraw-Hill, New York, USA, 5: 3-9.
- Parihar DS, SC Maheshwari and P Khurana** (1995) High frequency somatic embryogenesis and plantlet regeneration from hypocotyl protoplast cultures of *Brassica napus*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 42: 113-116.
- Reynolds J F** (1986) Regeneration in vegetable species. En: *Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol. 3. Plant regeneration and genetic variability*. I K Vasil, Ed. Academic Press, Inc: 151- 177.
- Yooup K, SF Chandler and TA Thorpe** (1987) *In vitro* propagation of chinese cabbage from seedling shoot tips. *Journal American Society Horticultura Science* 112: 841-845.
- Zee SY and BB Johnson** (1989) Cole crops. En: *Handbook of Plant Cell Culture. Vol 3 Crop species*. PV Ammirato, DA Evans, WR Sharp and Y Yamada, Eds. Mcmillan Publishing Co. New York: 227-245.