

# PRODUCCION MASIVA DE COLES A PARTIR DE VITROPLANTULAS

P. Díaz, O. Oliva, Y. Guía, H. Leonard, M. Simón, M. Piedra y M. Sunchiz.

Departamento de Biotecnología de las Plantas, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 26 de septiembre de 1994.

**RESUMEN.** La biotecnología de las plantas a nivel mundial constituye una vía importante para la producción de semilla de diferentes cultivares. En el caso de la col (*Brassica oleracea* L.) variedad Hércules esta biotecnología reporta para las condiciones cubanas, la posibilidad de la propagación a escala industrial de posturas de col a partir de pequeñas cantidades de semilla de híbridos de alto valor adquiridas en el extranjero u obtenidas en condiciones experimentales. El escalado de la micropropagación *in vitro* de 15 000 plántulas de esta especie, demostró las posibilidades que ofrece esta biotecnología. Se propone un sustrato para la adaptación de las vitroplántulas a las condiciones ambientales. Se ofrece un estudio comparativo preliminar de los rendimientos de las vitroplántulas en condiciones de producción, donde se comprobó que no existen diferencias significativas entre los repollos obtenidos por la vía biotecnológica y el método tradicional. Se muestran las variaciones somaclonales encontradas durante la micropropagación *in vitro* de la col las cuales son perfectamente controlables.

**ABSTRACT.** Plant biotechnology in the whole world constitutes an important way to seed production of different cultivars. The case of the cabbage (*Brassica oleracea* L.), variety Hercules, this biotechnology reports in Cuban conditions, the possibility of propagation in mass production of cabbage plants from small quantities of high value hybrid seeds acquired abroad or obtained in experimental condition. Scale-up micropropagation *in vitro* of 15 000 plants of this species demonstrated the advantage of this biotechnology. A substrate for adjustment of vitroplants to environmental condition is suggested. A preliminary comparative study of the vitroplants yield in production conditions is offered, where no significant response between cabbage obtained for both methods is corroborated. Somaclonal variation found during the *in-vitro* micropropagation of cabbage is shown and is perfectly under control.

## INTRODUCCION

La producción de semillas híbridas con alto valor comercial, es dominada por grandes transnacionales que ofertan sus productos en el mercado mundial a altos precios. A esto, se une que en el clima cubano se dificulta la floración de la col (*Brassica oleracea* L.) y por tanto, la obtención de cantidades suficientes de semilla botánica. La propagación *in vitro* da la posibilidad de hacer una producción masiva de posturas de col conservando las características genéticas donantes.<sup>1,2</sup> Esta micropropagación posibilita que a partir de pequeñas cantidades de semillas de híbridos de alto valor, se pueda realizar una producción masiva de vitroplántulas que podrían satisfacer las necesidades de semilla para la producción nacional.

Los objetivos de este trabajo consistieron en producir vitroplántulas en condiciones *in vitro* que posibilitaran demostrar la validez del sistema de micropropagación empleado; establecer una fase de cantero con un sustrato óptimo para la aclimatación de las vitroplántulas a condiciones ambientales y analizar la posible variación somaclonal inducida por la tecnología, realizando un estudio comparativo de la producción de coles obtenidas por las vías de propagación *in vitro* y semillero.

## MATERIALES Y METODOS

El medio de cultivo utilizado fue el de Murashige y Skoog modificado por Korneva,<sup>3</sup> el cual cuenta con macro, microelementos y un balance adecuado de la 6-bencilaminopurina con las otras fitohormonas para propiciar cada una de las fases de la biotecnología.

## Preparación del explante

Las semillas botánicas de col de la variedad Hércules, se lavaron con detergente doméstico durante 30 min con agitación. Posteriormente, se enjuagaron profusamente con agua corriente y se esterilizaron con dicromato de potasio por espacio de 15 min. Luego de diez enjuagues y en condiciones estériles, se le añadió etanol durante un minuto. Después, se le añadió una solución de dicloruro de mercurio al 0,2 % durante 20 min. Finalmente, se realizaron 10 lavados con agua destilada estéril para eliminar los restos del veneno. Para la fase de germinación, se colocaron 100s emillas botánicas en 250m L de agua destilada estéril y se pusieron en una zaranda durante una semana en condiciones de oscuridad a 25 °C.

Como testigo en cantero y campo se probaron plantas obtenidas de la germinación directa de la semilla botánica.

## Escalado de la producción en condiciones *in vitro*

Para el establecimiento de las condiciones *in vitro*, las plantas obtenidas directamente de las semillas, se colocaron en medio de establecimiento durante un mes hasta lograr una planta completa de 3a5c md ea ltura.

En la fase de propagación se utilizaron las yemas axilares de las plantas, logrando la multiplicación no sólo del meristemo apical, sino también, de las yemas de la base de la hoja. A partir del segundo estadio, se posibilitó la multiplicación utilizando los **hijos laterales**. La fase de enraizamiento se simultaneó con la propagación, pasando a medio de enraizamiento sólo las yemas apicales hasta el quinto estadio, en quiet odoe lm aterials ep usoa e nraizar.

Las vitroplántulas y posturas obtenidas por semillas fueron trasplantadas a las condiciones de cantero y campo a raíz desnuda. Para lograr un sustrato óptimo para la supervivencia de las posturas en condiciones naturales, se sembraron vitroplántulas en canaletas con las variantes de sustratos siguientes: (I) suelo ferralítico rojo (100 %), (II) zeolita (NEREA 3)(100 %), (III) mezcla de suelo ferralítico rojo con NEREA 3 (50:50), (IV) NEREA 3 con cachaza (50:50) y (V) suelo ferralítico rojo con cachaza (50:50). El riego se realizó dos veces al día para las variantes con suelo y cuatro para los sustratos con NEREA 3 en las primeras dos semanas, después, esta frecuencia disminuyó.

### Siembra en campo y evaluación del rendimiento

Al mes de plantadas en canteros y antes de transplantarlas para el campo, se determinó por lotes la sobrevivencia (%), altura (cm) de la planta, diámetro (cm) del tallo y área foliar (cm<sup>2</sup>).

En condiciones de producción y mediante un diseño de bloques al azar, se compararon los dos propágulos: vitroplántulas y testigos, en un suelo ferralítico rojo con cuatro réplicas. A los tres meses (enero - marzo) se determinó la formación de repollo (%), la calidad,<sup>4</sup> el peso (kg) y los diámetros polar y ecuatorial (cm).

### Tratamiento estadístico

Se realizó un análisis de varianza<sup>5</sup> comparando los dos propágulos para los diferentes caracteres evaluados en cada sustrato en la fase de adaptación de las vitroplántulas a can-

tero. Las medias se compararon según el test de rangos múltiples de Duncan.<sup>6</sup> Para la caracterización de la población obtenida, se seleccionó al azar, el 42,2 % de las vitroplántulas y los testigos. La comparación de los rendimientos se realizó mediante un test de Student<sup>7</sup> entre los dos propágulos: testigos y vitroplántulas.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Propagación *in vitro* de las plantas

Se lograron establecer seis líneas de propagación a partir de la germinación de las semillas botánicas, las cuales hicieron posible la obtención de 15 000 posturas en la etapa de enraizamiento.

El coeficiente de propagación se comportó entre 10y 15 por planta sembrada por mes, lo cual es adecuado para el cultivo en cuestión. El enraizamiento de los lotes fue del 98,3 % .

En otras condiciones, se han logrado hasta 50hijos por planta en 45 d, empleando dosis altas de bencilaminopurina.<sup>8</sup> Estos niveles de hormona pueden influir en la aparición de diferentes tipos de malformaciones morfológicas o cambios en la calidad de la planta como alimento<sup>9</sup> en condiciones de producción.

### Análisis de los sustratos

Las variantes con suelos ofrecieron mejores resultados en cuanto a la calidad de las posturas se refiere, observándose una altura superior en las plantas correspondientes a la variante I y diferente, pero no significativamente, a las vitroplántulas el variante V( Tabla I).

**TABLA I**  
**Comportamiento de las vitroplántulas en canteros**

| Variante de sustrato               | Propágulos | Sobrevivencia (%) | Altura (cm) | Diámetro (cm) | Area foliar activa (cm <sup>2</sup> ) |
|------------------------------------|------------|-------------------|-------------|---------------|---------------------------------------|
| I<br>suelo (100)                   | Plántulas  | 92                | 4,45 abc    | 0,123 d       | 42,27 l                               |
|                                    | Testigos   | 88                | 3,79 abc    | 0,182 e       | 71,85 e                               |
| II<br>NEREA 3 (100)                | Plántulas  | 90                | 2,88 bc     | 0,156 g       | 25,41 h                               |
|                                    | Testigos   | 100               | 3,33 abc    | 0,153 h       | 31,99 g                               |
| III<br>NEREA 3 (50)<br>suelo (50)  | Plántulas  | 98                | 1,83 c      | 0,171 f       | 30,62 g                               |
|                                    | Testigos   | 92                | 5,26 ab     | 0,219 c       | 104,92 c                              |
| IV<br>NEREA 3 (50)<br>cachaza (50) | Plántulas  | 100               | 2,57 c      | 0,219 c       | 46,20 f                               |
|                                    | Testigos   | 100               | 5,12 ab     | 0,245 b       | 123,00 b                              |
| V<br>suelo (50)<br>cachaza (50)    | Plántulas  | 96                | 3,74 abc    | 0,247 b       | 75,84 d                               |
|                                    | Testigos   | 90                | 6,19 a      | 0,283 a       | 177,18 a                              |

Las letras muestran diferencias significativas según el test de rangos múltiples de Duncan ( $p \leq 0,5$ ).

Con relación al diámetro del tallo, los mejores resultados se obtuvieron en la variante V, seguidos de la mezcla NEREA 3 con cachaza (variante IV).

El área foliar resultó un parámetro de gran variabilidad para esta especie, por lo que no se recomienda como un indicador de control de la calidad de las producciones de esta especie. Esto puede estar relacionado con el hecho de que la semilla botánica germina directamente en semilleros y no sufre los efectos negativos del trasplante ni de un cambio de las condiciones *in vitro* a las de cantero que sí sufren las vitroplántulas.

No obstante, en condiciones de campo, ambas posturas llegaron a igualarse en sus características agronómicas (Tabla II).

En general, los autores recomiendan utilizar como sustratos en esta fase, aquellos materiales que retengan la humedad, lo cual favorece el enraizamiento de las vitroplántulas y constituye un ahorro importante de agua.

### Análisis de la variación somaclonal

Las malformaciones somaclonales más frecuentes (Tabla III), se observaron en condiciones de cantero. Real-

zando una evaluación en el momento del trasplante de la muestra, se pudo observar que resultan posibles de eliminar, aquellas posturas que presentan variaciones somaclonales visibles.

En condiciones de campo, se observaron variaciones en la calidad del repollo de las vitroplántulas, debido al efecto heterogéneo del ambiente (Tabla IV).

**TABLA II**  
**Datos agronómicos de la cosecha**

| Especie        | Total          |              | %    | Peso medio | Diámetro   |       |
|----------------|----------------|--------------|------|------------|------------|-------|
|                | Individuos (A) | Repollos (B) |      |            | Ecuatorial | Polar |
| Vitroplántulas | 634            | 574          | 90,5 | 1,806      | 63,8       | 55,1  |
| Testigos       | 634            | 591          | 93,2 | 1,648      | 59,8       | 51,3  |

**TABLA III**  
**Formas somaclonales encontradas en las canteros**

| Malformaciones        | Cantidad | %           |
|-----------------------|----------|-------------|
| Total de individuos   | 634      | 100,00      |
| Tallos malformados    | 5        | 0,78        |
| Tallos con multiyemas | 4        | 0,63        |
| <b>TOTALES</b>        | <b>9</b> | <b>1,41</b> |

**TABLA IV**  
**Rendimientos del cultivo y calidad del repollo**

| Calidad del repollo    | Testigos | Vitroplántulas |
|------------------------|----------|----------------|
|                        | (%)      |                |
| A                      | 21,8     | 27,7           |
| B                      | 29,6     | 29,6           |
| C                      | 37,5     | 25,9           |
| D                      | 10,0     | 16,6           |
| Rendimiento ( t / ha ) | 33,7     | 38,7           |

De las variaciones encontradas en las condiciones de cantero, sólo perduró en las de campo, la aparición de hijos en la base de un repollo o más de un repollo por planta (multiyemas), hecho que ocurrió en un 8,03 % de la producción total de vitroplántulas. Esto pudo deberse a que se mantuvieron aún los efectos de la concentración de la 6-bencilaminopurina utilizada en el medio de propagación, en los tejidos de los vegetales, fundamentalmente en las plantas enraizadas de la yema apical, ya que en la zona cercana al meristemo se encontraron numerosas yemas laterales en estado latente.

Debe evitarse la propagación *in vitro* de las multiyemas que nacen en ocasiones con los hijos laterales, la cual está reportada en diferentes cultivos como una fuente de variación somaclonal.<sup>1,2</sup>

### **Análisis de los rendimientos**

Los rendimientos agrícolas, algo superiores en las vitroplántulas, no fueron significativamente diferentes de la variedad donante (Tabla IV). De la misma forma, los parámetros

de calidad y el diámetro del repollo no difirieron de los correspondientes a los testigos, lo que demostró que el método de propagación ensayado no afecta los resultados agrícolas de la especie (Tabla II).

### **CONCLUSIONES**

Se estableció una metodología para la col de repollo que permite reproducir la cantidad de vitroplántulas de esta especie que sea necesaria con un coeficiente de propagación de 10a 15 plantas.

La obtención de la variación somaclonal no deseada existe como en otros cultivos, pero resulta controlable con una adecuada propagación *in vitro* y selección en canteros.

Se establecieron los sustratos con suelos y mezclas de materia orgánica para la fase de adaptación de las vitroplántulas correspondientes a las condiciones naturales.

Las coles obtenidas de vitroplántulas no difieren significativamente de las que se obtienen a partir de semilla botánica en relación con el rendimiento en peso, el diámetro del repollo y la calidad de la col.

### **AGRADECIMIENTOS**

A los trabajadores y estudiantes del Instituto Preuniversitario Vocacional de Ciencias Exactas "Humbolt 7", de San Antonio de los Baños, La Habana.

### **BIBLIOGRAFIA**

1. Lillo C. **Hort. Science**, **21**, 315, 1992.
2. Selvapandian J., Subramani J., Bhatt P.N. and Mehta A. R. **Plant Science**, **56**, 81, 1988.
3. Korneva S. y Maribona R. H. **Avances en Biotecnología Moderna**, **1**, 14, 1992.
4. Minnetti P.L. **Hort Science**, **10**, 54, 1975.
5. Scheffe H. *Analysis the Variance*, John Wiley and Sons Inc. London, 1967.
6. Duncan D.R. **Biometrics**, **11**, 1, 1965.
7. Gosset W.S. **Biometrics**, **29**, 363, 1938.
8. Alonso A. y Capote A. Reproducción acelerada de la col *in vitro*. Resúmenes del VIII Seminario Científico del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, 79, 1992.
9. Manresa A., Sampere E. , Díaz P. y Oliva O. Caracterización morfológica, físico-química y nutricional de la col de repollo obtenida por cultivo de tejidos. Memorias de la 4. Conferencia Internacional de Tecnología de los Alimentos, Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria. La Habana, Cuba, 14-17, 1982.