

Micropropagación de especies hortícolas de interés comercial para Cuba. II. *Allium cepa* L cv. Caribe-71

AMELIA CAPOTE Y O PÉREZ

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

RESUMEN

En este trabajo se estudió el efecto de diferentes reguladores del crecimiento y explantos en la micropropagación *in vitro* de cebolla (*Allium cepa* L.), a fin de establecer una metodología adecuada para la multiplicación de genotipos seleccionados utilizados en el mejoramiento genético.

Los mayores índices de multiplicación se obtuvieron en el medio MS con las sales minerales diluidas al 50%, suplementado con 0,5 mg. l⁻¹ de ANA y 4 mg. l⁻¹ de BAP cuando se utilizaron como explantos las plántulas obtenidas a partir de yemas seccionadas longitudinalmente a la mitad por su parte basal. El índice de multiplicación varió desde 5,6 hasta 12,8 brotes.explanto⁻¹ de acuerdo al genotipo utilizado. Los brotes, una vez enraizados, fueron transferidos a un sistema de agricultura orgánica donde crecieron hasta su bulbificación.

Palabras clave: *Allium cepa*, cebolla, micropropagación, *in vitro*, reguladores del crecimiento.

Micropropagation of horticultural species of economic interest for Cuba. II. *Allium cepa* L cv. Caribe-71

SUMMARY

The effect of different growth regulators and explants on the micropropagation *in vitro* of onion (*Allium cepa* L. cv. Caribe-71) was studied in order to establish a methodology for the multiplication of selected genotypes used in plant breeding programs.

The best multiplication rate was obtained when the explants, small plant obtained from buds with longitudinal cuts at the basal parts (two sections) were cultivated in MS medium with mineral salts at at 50% normal concentration supplemented by 0,5 mg. l⁻¹ NAA and 4 mg. l⁻¹ BAP.

This method allowed production of 5,6 and 12,8 shoots.explant⁻¹, depending on cultivar. The rooted shoots were transferred to an organic agriculture system where they grow until bulbification.

Keywords: *Allium cepa*, onion, micropropagation, *in vitro*, plant growth regulators.

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

INTRODUCCIÓN

La cebolla (*Allium cepa* L.) constituye en Cuba una de las principales especies hortícolas, debido a su amplia demanda entre la población para ser utilizada como condimento. Sin embargo, presenta grandes dificultades para su cultivo, y su rendimiento es muy bajo. Esto se debe a que las condiciones climáticas, especialmente la temperatura y la longitud del día, no favorecen su normal desarrollo (Muñoz y Prats, 1984). Por ello, es objeto de numerosos programas de investigación, a fin de obtener cultivares mejor adaptados a las condiciones climáticas cubanas (Muñoz *et al.*, 1994).

No obstante, existen grandes dificultades para su recombinación sexual, ya que al no florecer normalmente, se requieren de costosos procedimientos de vernalización y aún así es insatisfactoria la floración para todos los cultivares (Muñoz *et al.*, 1985).

Las técnicas de cultivo de tejidos han sido ampliamente utilizadas en muchas especies con la finalidad de proveer una vía de propagación que facilite la multiplicación y el mantenimiento de genotipos de interés.

En cebolla se han realizado numerosos trabajos a fin de obtener una elevada tasa de multiplicación, analizándose para ello el efecto de diferentes explantos (Hussey, 1978; Hussey y Falavigna, 1980; Phillips y Hubstenberger, 1987, Pike y Yoo, 1990), combinaciones hormonales (Dunstan y Short, 1977 b; Phillips y Luteyn, 1983; Havel y Nývák, 1985; Kahane *et al.*, 1992) y genotipos (Phillips y Hubstenberger, 1987; van der Walk *et al.*, 1992). Sin embargo, las distintas metodologías no pueden aplicarse directamente a otros cultivares debido a sus diferentes características genéticas y fisiológicas, que determinan respuestas muy diferentes.

El objetivo de este trabajo fue establecer una metodología para la propagación acelerada de cultivares de cebolla de interés económico para Cuba, que garantice una rápida multiplicación con vistas a su utilización en programas de mejoramiento.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

Para desarrollar este trabajo fue seleccionado el cv. Caribe-71 por ser la variedad cubana de mayor distribución en el país por su adaptación a las condiciones climáticas locales con rendimientos aceptables.

Explantos

Se utilizaron como explantos las yemas extraídas de los bulbos de un tamaño de 1 - 1,5 cm de longitud. Se desinfectaron en etanol 70% por 10 min, seguido de 5% NaOCl por 20 min. Luego de retirarle las hojas más externas se procedió a realizar una segunda desinfección sumergiéndolas nuevamente en hipoclorito de sodio a igual concentración durante otros 10 min, y finalmente, se procedió al lavado de los explantos con agua destilada estéril por 3 veces.

En el momento de la siembra se utilizaron dos variantes, las yemas enteras y las yemas divididas longitudinalmente en cuatro secciones por su parte basal, con el objetivo de eliminar la dominancia apical y provocar el desarrollo de las yemas adyacentes.

Los explantos fueron cultivados en el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con las sales minerales diluidas al 50% y 30 g.l⁻¹ de sacarosa. En todos los casos el pH del medio fue ajustado a 5,8 antes de añadir el agar (7 g.l⁻¹) y esterilizados en un autoclave a 121°C y 1,5 kg.cm² durante 20 min.

En un segundo experimento y con la finalidad de aumentar la tasa de multiplicación obtenida, se utilizaron las yemas de las plántulas obtenidas *in vitro* a partir de la utilización de yemas de bulbos cultivadas enteras, las cuales fueron divididas longitudinalmente en dos secciones.

Reguladores del crecimiento

El efecto de los diferentes reguladores del crecimiento se evaluó utilizando como explant-

tos las yemas extraídas de los bulbos del cv. Caribe-71, en sus dos variantes: enteras y divididas longitudinalmente en cuatro secciones.

Para evaluar el efecto de las citocininas, el medio MS fue suplementado con diferentes concentraciones de 6-bencil amino purina (BAP), 6-furfuril amino purina (CIN) o de 6 γ , γ - dimetilalilamino purina (2iP), adicionándose en todos los casos 0,05 mg. l⁻¹ de ANA (ácido naftalen acético).

El efecto de las auxinas fue estudiado adicionando al medio diferentes concentraciones de ANA, ácido 3-indol acético (AIA) o de ácido indol butírico (AIB), agregando en todos los casos 4 mg. l⁻¹ de BAP.

Genotipo

El protocolo desarrollado en este trabajo para la inducción de brotes en el cv. Caribe-71 fue empleado en otros cultivares para determinar el efecto que ejerce el genotipo sobre el número de brotes obtenidos. Para ello fueron seleccionados los cvs. Jagua 9-72 (bulbo rojo), Tropical CA-36 (bulbo amarillo) y Tropical CB-42 (bulbo blanco), todos resultantes de trabajos de mejoramiento genético en esta especie realizados en el Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT, La Habana, Cuba).

El medio utilizado fue el establecido en las etapas anteriores (MS con las sales minerales al 50% y la adición de 0,5 mg.l⁻¹ ANA y 4 mg.l⁻¹ BAP).

Enraizamiento de los brotes

Los brotes obtenidos fueron transplantados para su enraizamiento en los siguientes medios de cultivo: (I) BDS (Dunstan y Short, 1977 a) + 0,1 mg. l⁻¹ de ANA y 0,1 mg. l⁻¹ de CIN; (II) MS + 0,5 mg. l⁻¹ de AIB y 0,1 mg. l⁻¹ de BAP; (III) MS + 1 mg. l⁻¹ de AIB y 0,1 mg. l⁻¹ de BAP y (IV) MS + 0,5 mg. l⁻¹ de ANA, los cuales fueron utilizados en dos variantes: só-

lidos (7 g.l⁻¹ de agar) y líquidos, empleando como soporte un puente de papel de filtro.

En todos los experimentos, los explantos, contenidos en tubos de ensayo con 25 ml de medio de cultivo, fueron incubados en un fotoperíodo de 14 h y a una temperatura de 25 \pm 2°C durante un período de 21 días.

Para la fase de adaptación, las plántulas fueron transplantadas en la 1ra. quincena de Noviembre (fecha óptima de siembra para este cultivo). Se utilizaron dos variantes: una pre-adaptación en macetas con diferentes sustratos (suelo, zeolita y arena) y una siembra directa en un sistema de agricultura orgánica en un sustrato, suelo Ferralítico Rojo: materia orgánica (50% v/v), y la aplicación del bio-preparado Oniobiostín, el cual tiene como base la cepa INIFAT-17 de *Azotobacter chroococcum*.

Análisis de los resultados

En todos los experimentos realizados se evaluó el número de explantos que respondían al tratamiento y el número de brotes.explanto⁻¹. Se evaluaron un total de 10 tubos por tratamiento y se realizaron 3 repeticiones.

Los resultados obtenidos en los diferentes experimentos fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza simple (efecto de las citocininas y genotipo) o bifactorial (efecto de las auxinas y enraizamiento de los brotes) y las diferencias significativas determinadas por la prueba de rangos múltiples de Duncan (P < 0,05).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción de brotes

Al realizar el cultivo de las yemas extraídas de los bulbos se observó, en primer lugar, que el número de explantos que respondieron al tratamiento fue mayor cuando se emplearon las yemas enteras (90-100% de

brotación) que cuando se utilizan las divididas longitudinalmente (60-70% de brotación), independientemente de la combinación hormonal utilizada (datos no mostrados). Esto puede deberse a que el corte realizado destruyó tejidos necesarios para el posterior crecimiento de los brotes, tanto axilares como adventicios.

Al analizar el número de brotes.explanto⁻¹, se observó que al emplear las yemas enteras se desarrollo un brote solamente, independientemente de las concentraciones y tipo de regulador utilizado. Esto no fue así cuando se utilizaron las yemas divididas longitudinalmente, donde se observó que la inducción de brotes varió en relación al tipo de reguladores vegetales adicionados al medio de cultivo.

Al analizar el efecto de la adición de diferentes citocininas (Fig. 1) se observó que la mayor respuesta se obtuvo en los medios suplementados con 4 mg. l⁻¹ de BAP donde se

alcanzó un índice de multiplicación de 4,5 brotes.explanto⁻¹. La adición de concentraciones altas (8 mg.l⁻¹) resultó inhibitoria para el desarrollo de los brotes.

La utilización de 2iP mostró una respuesta de 2,5 brotes.explanto⁻¹ cuando se adicionó en una concentración de 4 mg.l⁻¹. Por otra parte, fue necesaria la presencia de la CIN en una concentración superior en el medio de cultivo (10 mg.l⁻¹) para obtener igual número de brotes que con 2iP. No obstante en ninguna de las concentraciones utilizadas de estos dos reguladores vegetales, se obtuvo una respuesta similar a la obtenida con la adición de BAP.

El efecto estimulante del BAP (2-4 mg. l⁻¹) en la inducción de brotes de cebolla ya fue indicado anteriormente por Hussey (1978) al utilizar ápices. Este autor obtuvo de 3 - 5 brotes.explanto⁻¹ y planteó que la utilización tanto del BAP como del 2iP en concentracio-

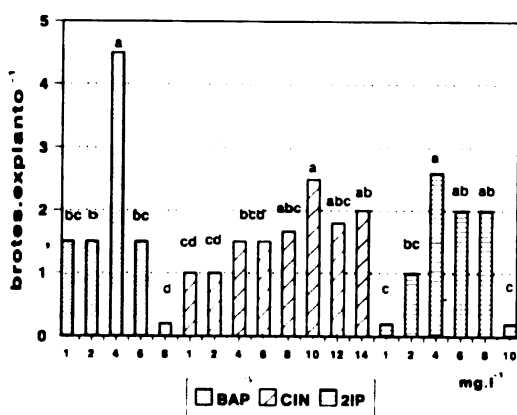


Figura 1. Efecto de diferentes citocininas en la inducción de brotes de cebolla cv. Caribe-71, utilizando como explantos las yemas de los bulbos divididas longitudinalmente. BAP: 6-bencil amino purina, CIN: 6-furfuril amino purina, 2iP: 6- γ , γ dimetilalilamino purina. Los promedios seguidos de igual letra no difieren significativamente al 5% del test de Duncan.

Effect of different cytokinins on shoot induction in onion cv. Caribe-71. Means follow by the same letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's test.

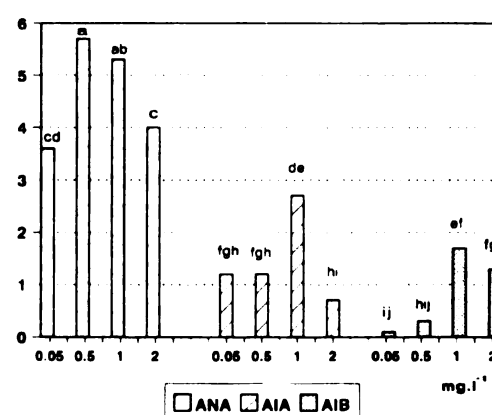


Figura 2. Inducción de brotes en cultivo de tejidos de cebolla en presencia de diferentes concentraciones de auxinas al utilizar como explantos las yemas de los bulbos divididas longitudinalmente. ANA: ácido naftalén acético, AIA: ácido indol acético, AIB: ácido indol butírico. Los promedios seguidos de igual letra no difieren significativamente al 5% del test de Duncan.

Shoots induction in tissue culture of onion with different auxins. Means follow by the same letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's test.

nes más altas de 4 mg. l⁻¹ poseían un efecto inhibitorio, lo cual no coincide con los presentes resultados.

La respuesta de las yemas divididas varió también en relación con las diferentes auxinas estudiadas, así como para la concentración de las mismas (Fig. 2). Las mejores respuestas se obtuvieron con la utilización del ANA, seguida del AIA y por último el AIB, en el cual el desarrollo de brotes múltiples mostró una disminución con relación a las demás. Los mejores resultados fueron obtenidos con la adición al medio de 0,5 mg. l⁻¹ de ANA lográndose un índice de multiplicación de 5,6 brotes.explanto⁻¹.

En general con la utilización de las yemas extraídas de los bulbos, aún con las dos variantes empleadas (enteras y divididas longitudinalmente en cuatro secciones), los resultados de la tasa de multiplicación obtenidos resultaron relativamente bajo (4 - 5 brotes.explanto⁻¹).

Por ello, con el objetivo de aumentar la inducción de brotes, se seleccionaron las plántulas obtenidas *in vitro* a partir de yemas enteras, resultantes del experimento anterior. Estas fueron divididas longitudinalmente en dos porciones para la destrucción del meristema apical y eliminar de esta manera la dominancia que éste ejerce sobre las demás yemas. Ambas porciones fueron cultivadas en el medio MS con las sales minerales diluídas al 50% y la adición de 0,5 mg. l⁻¹ de ANA y 4 mg. l⁻¹ de BAP, seleccionados de acuerdo a los resultados obtenidos en los experimentos anteriores.

En estas condiciones se obtuvo una abundante proliferación de brotes, lográndose un índice de multiplicación de 12,8 brotes.explanto⁻¹ como promedio, llegando en algunos casos hasta más de 20 brotes. En esta forma se aumenta de manera considerable el número de individuos obtenidos a partir de un explanto inicial (Foto 1).

Estos brotes pudieron ser utilizados como explantos en una segunda generación *in vitro*, después de realizarles el mismo corte descri-

to, obteniéndose una tasa de multiplicación de 6,2 brotes.explanto⁻¹. Posteriores multiplicaciones *in vitro* tendieron a disminuir el número de brotes inducidos hasta resultar prácticamente nula. Esta disminución a partir de la segunda generación fue descrita por Hussey y Falavigna (1980), planteando que es debida a una temprana senescencia de los brotes, así como a la dormancia que ellos muestran a partir de esta generación.

Por otra parte se observó, que la cantidad de brotes inducidos varió en dependencia del genotipo utilizado, obteniéndose una tasa de multiplicación de 11,4; 7,3 y 5,8 brotes.explante⁻¹ para los cvs. Tropical CB-42, Jagua 9/72 y Tropical CA-36 respectivamente (Fig. 3). Se ha planteado que la respuesta de los cultivos *in vitro* de cebolla está determinada por el genotipo del explanto utilizado (Phillips y Hubstenberger, 1987; Lu *et al.*, 1989), lo cual quedó demostrado en los cultivos ensayados.

Enraizamiento de brotes y adaptación a condiciones externas

En cuanto al enraizamiento de los brotes (Fig. 4) se observó que en la mayoría de las

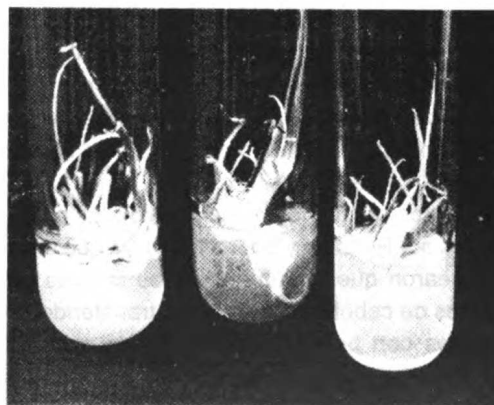


Foto 1. Inducción de brotes en cebolla cv. Caribe-71 en medio MS(1/2)+ 0,5 mg. l⁻¹ de ANA y 4 mg. l⁻¹ BAP, utilizando como explantos las yemas de las plántulas obtenidas *in vitro*.

Shoots induction in onion cv. Caribe-71 on MS(1/2) + 0,5 mg. l⁻¹ ANA and 4 mg. l⁻¹ BAP.

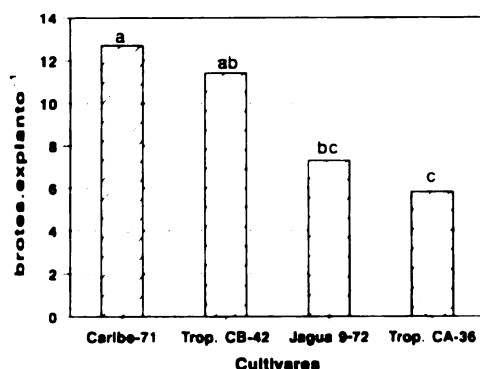


Figura 3. Efecto de diferentes cultivares sobre la inducción de brotes de cebolla in vitro. (MS + 0,5 mg.l⁻¹ ANA y 4 mg.l⁻¹ BAP). Los promedios seguidos de igual letra no difieren significativamente al 5% del test de Duncan.

Effect of different cultivars on the in vitro shoots induction of onion (MS + 0,5 mg.l⁻¹ ANA y 4 mg.l⁻¹ BAP). Means follow by the same letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's test.

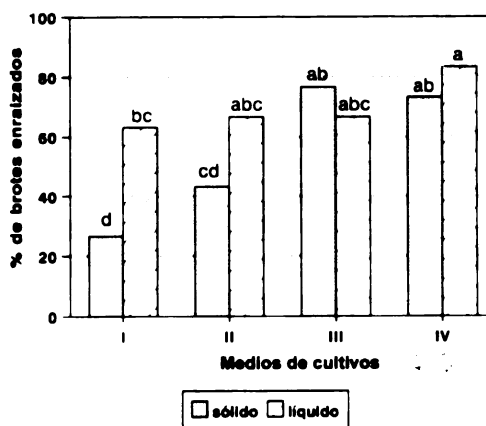


Figura 4. Porcentajes de brotes de cebolla enraizados en diferentes medios de cultivo. Los promedios seguidos de igual letra no difieren significativamente al 5% del test de Duncan.

Rooting shoots of onion in different culture medium. Means follow by the same letter are not significantly different at the 5% level by Duncan's test.

variantes empleadas, la respuesta en los medios líquidos resultó superior a la obtenida cuando los medios se solidificaron con agar. Así mismo los mayores porcentajes de brotes enraizados (83,34) se obtuvieron en el medio MS suplementado con 0,5 mg. l⁻¹ de ANA, desarrollando los brotes un sistema radical óptimo y estando en condiciones de ser transferidos a campo.

Estos resultados coinciden con los publicados por Dunstan y Short (1978), ya que ellos plantearon que los brotes de los cultivos de tejidos de cebolla necesitan ser transferidos a medios con baja concentración de auxinas para estimular la formación de raíces. Sin embargo, otros autores plantean que pueden desarrollarlas directamente en los medios de inducción de brotes (Dunstan y Short, 1977b; Hussey, 1978).

La mayor sobrevivencia de las plántulas (98%) se obtuvo al transplantarlas directamen-

te a un sistema de agricultura orgánica, ya que los porcentajes obtenidos en macetas fueron muy bajos, independientemente del sustrato utilizado. Esto es debido a que en estas condiciones la humedad del sustrato es muy difícil de controlar, lo cual es perjudicial para las plantitas de cebolla en esta fase. Además, las condiciones de invernadero no favorecen el desarrollo de las mismas, ya que ellas requieren de alta irradiancia durante su adaptación.

La sobrevivencia y adaptación a condiciones naturales de las plantitas obtenidas *in vitro* fue estimulada por la aplicación del biopreparado Oniobiostín, el cual propicia el desarrollo de diferentes órganos de la planta (Dibut *et al.*, 1992) y facilita el endurecimiento de las mismas. Las plantas crecidas en estas condiciones se desarrollaron normalmente hasta su bulbificación.

BIBLIOGRAFÍA

- Dibut B, R Martínez, MC Acosta y R González** (1992) Respuesta de la cebolla en semilleros a la inoculación de *Azotobacter chroococcum* en diferentes suelos y regiones de Cuba. En: Resúmenes de Biotecnología para el mejoramiento de cultivos en América Latina, Biocela, Caracas, Venezuela: 63-66.
- Dunstan DI and KC Short** (1977a) Improved growth of tissue culture of the onion, *Allium cepa*. *Physiologia Plantarum* 41: 70-72.
- Dunstan DI and KC Short** (1977b) *In vitro* studies on organogenesis and growth in *Allium cepa* tissue cultures. *Acta Horticulturae* 78: 139-145.
- Dunstan DI and KC Short** (1978) Shoot production from onion callus tissue cultures. *Scientia Horticulturae* 9: 99-110.
- Fujieda K, N Matsuoka and Y Fujita** (1979) Vegetative multiplication of onion, *Allium cepa* L., through tissue culture. *Journal Japan Society Horticultural Science* 48: 186-194.
- Havel L and FJ Nývák** (1985) Meristem-tip culture of *Allium cepa* L. *Scientia Horticulturae* 27: 209-214.
- Hussey G** (1978) *In vitro* propagation of the onion *Allium cepa* by axillary and adventitious shoot proliferation. *Scientia Horticulturae* 9: 227-236.
- Hussey G and A Falavigna** (1980) Origin and production of *in vitro* adventitious shoots in the onion (*Allium cepa* L.) *Journal Experimental Botany* 31: 1675-1680.
- Kahane R, M Rancillac and B Teysendler** (1992) Long-term multiplication of onion (*Allium cepa*) by cyclic shoot regeneration *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 28: 281-288.
- Lu C, Z Currah and EB Peffley** (1989) Somatic embryogenesis and plant regeneration in diploid *Allium fistulosum* x *Allium cepa* F₁ hybrid hybrid onions. *Plant Cell Report* 7: 696-700.
- Muñoz L y A Prats** (1984) Investigaciones sobre las variaciones en los rendimientos de la cebolla en Cuba. Editorial Academia, la Habana. 69 pp.
- Muñoz L, JJ Pérez y A Prats** (1985) Producción de semilla de cebolla en condiciones normales. Reporte de investigación del INIFAT. 26. 54 pp.
- Muñoz L, A Prats y G Brito** (1994) Mejoramiento de hortalizas para condiciones tropicales. En: 90 Años de la Estación Experimental Agronómica de Santiago de Las Vegas, 57-70.
- Murashige T and F Skoog** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Phillips GC and KJ Luteyn** (1983) Effects of picloram and others auxins on onion tissue cultures. *J American Society Horticultural Science* 108: 948-953.
- Phillips GC and JF Hubstenberger** (1987) Plant regeneration *in vitro* of selected *Allium* species and interspecific hybrids. *Hortscience* 22: 124-125.
- Pike LM and KS Yoo** (1990) A tissue culture technique for the clonal propagation of onion using immature flower buds. *Scientia Horticulturae* (Netherlands) 45: 31-36.
- van der Valk P, O E Scholten, F Verstappen, R C Jansen and J J M Dons** (1992) High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo-derived callus cultures of three *Allium* species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 30: 181-191.