

ESTABLECIMIENTO Y PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE ZANAHORIA (*DAUCUS CAROTA* L.).

Arlene Rodríguez Manzano, Amelia Capote Rodríguez, María Bénitez, Luz D. Liñeiro, Dayamí Pérez, Norma Marrero y Ana Domínguez.

**Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical (INIFAT)
Calle 2 esq. 1 Santiago de las Vegas, Ciudad de La Habana, Cuba, CP 17200.
Email: arlene@inifat.co.cu**

RESUMEN

La producción de semilla original de zanahoria fundamentalmente con variedades introducidas puede verse afectada ya que no todas emiten inflorescencias en las condiciones de clima tropical. En este trabajo se estudia el comportamiento en cultivo *in vitro* de la variedad brasileña `Alboreada`, con el objetivo de proponer una metodología para su propagación. Se establecieron protocolos de desinfección de semillas con alcohol y bicloruro de mercurio en diferentes tiempos de exposición y la germinación se realizó en un medio MS modificado. Para la propagación se utilizaron como explantes los ápices y nudos de las vitroplantas obtenidas de la germinación *in vitro*, los cuales se transplantaron a medios de cultivo MS suplementados con diferentes concentraciones de 6 bencil amino purina (BAP) y ácido indol acético (AIA). Se realizaron dos subcultivos cada 30 días, las evaluaciones se realizaron teniendo en cuenta las variables: porcentaje de regeneración, número de brotes mayores de 1 cm (NB) y número de explantes totales (ET). Los datos (NB y ET) se sometieron a un análisis de varianza bifactorial (medio de cultivo x subcultivo) con un diseño completamente aleatorizado con 12 repeticiones. La desinfección seleccionada fue con alcohol y bicloruro de mercurio durante 2 y cinco minutos respectivamente y la mejor respuesta en la propagación a partir de ápices y nudos se obtuvo en el medio MS suplementado con 2 mg/l de BAP y 0.05 mg/L de AIA. Se realizaron estudios preliminares sobre el enraizamiento y la adaptación de vitroplantas a condiciones de organóponico.

Palabras claves: zanahoria, *in vitro*, semillas, medios, ápices.

ESTABLISHMENT AND PROPAGATION *IN VITRO* OF CARROT (*DAUCUS CAROTA* L.)

ABSTRACT

The original seed production in carrot principally with introduced varieties can turns affected since not all varieties emit inflorescences under the conditions of tropical climate. In this paper the behaviour is studied *in vitro* cultivation of Brazilian variety `Alboreada`, with the objective of proposing a methodology for its propagation. Protocols of seeds disinfection was make with alcohol and bicloruro of mercury in different times. The germination seeds were carried out in a half modified MS medium. For propagation purpose were used as explants the apices and buds from vitroplants obtained of the *in vitro* germination, those which were transfered to MS medium supply with different concentrations of BAP and AIA. Two subcultures carried out every 30 days. The evaluations were carried out keeping the following variables: regeneration percentage, number of buds bigger than 1 cm (NB) and number of total explants (ET). The data (NB and ET) underwent an analysis of variance bifactorial

(culture medium x subculture) with a design totally randomized with 12 repetitions. The selected disinfection treatment used alcohol and bicloruro of mercury during 2 and 5 minutes respectively and the best answer in the propagation using from apices and buds was obtained with the MS medium supply with 2 mg/l of BAP and 0.05 mg/L of AIA. Preliminary studies about the roots and vitroplants adaptation to organoponics conditions were carried out.

Key words: carrot, *in vitro*, seeds, means, apexes.

INTRODUCCION

La zanahoria (*Daucus carota*) es una hortaliza de conocida importancia vitamínica por los efectos positivos de sus carotenos, ya que favorecen la agudeza visual y la visión nocturna. Las hojas contienen alcaloides, pero la mayor importancia se debe a la raíz carnosa, rica en multitud de nutrientes, entre los que cabría destacar las vitaminas B, C y en mayor cantidad, lo que se denomina pro-vitamina A, una sustancia que estimula la producción de vitamina A. Posee también carotina, un compuesto que le da su característico color anaranjado (Pardo, 1999)

En Cuba los programas de mejoramiento en este cultivo han estado encaminados entre otros aspectos a lograr variedades que produzcan semillas en nuestras condiciones climáticas y específicamente en el INIFAT existen variedades que emiten las inflorescencias, siendo factible la producción de semillas a nivel local (Rodríguez Nodals y col, 2002).

Las técnicas de cultivo de tejidos cada día tienen mayor importancia en la obtención de semillas de alta calidad (Rodríguez Manzano y col., 2003; 2005) y también es utilizada como un importante instrumento como apoyo a los programas de mejoramiento genético fundamentalmente (Capote y col., 2000; 2003; 2004; Rodríguez Manzano y col, 2005).

El cultivo *in vitro* de la zanahoria puede apoyar a los mejoradores en la obtención de mayor disponibilidad de plantas a partir de variedades introducidas, donde existen limitaciones en la obtención de semillas, así como para lograr nueva variabilidad de interés para los programas de mejoramiento genético.

El presente trabajo tiene como objetivo estudiar el comportamiento *in vitro* de la zanahoria tomando como modelo la variedad `Alborada´ introducida de Brasil, para obtener un método eficiente de regeneración y propagación *in vitro*, que pueda ser empleado en los programas de mejoramiento de este cultivo, y como apoyo en la producción de semillas de esta hortaliza.

MATERIALES Y METODOS

En este trabajo se utilizó la variedad `Alborada´ que fue introducida en el 2003 proveniente de EMBRAPA, Brasil. Esta variedad proviene del cruzamiento entre Brasilia Kuronan y un germoplasma silvestre de la zona de Río Grande del Sur. Se recomienda para plantaciones de verano, ya que es moderadamente resistente a enfermedades y presenta el valor más alto de carotenoides totales (cerca del 35%) el cual es superior a los encontrados hasta el momento en otras variedades (Vidal Vieira y col., 2003).

Para el establecimiento *in vitro* se establecieron protocolos de desinfección de semillas con un tratamiento de alcohol durante 2 minutos y bicloruro de mercurio durante 5, 10 y 15

minutos. Las semillas se colocaron en un medio de germinación Knop, a la oscuridad. A las cuatro o cinco semanas de germinadas las semillas, se aislaron los ápices y nudos y se cultivaron en el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con diferentes concentraciones de 6 bencil amino purina (BAP), combinada con una concentración constante de ácido indol acético (AIA) (Tabla 1).

Tabla 1. Medios de cultivos empleados para la propagación y obtención de callos a partir de nudos y ápices de zanahoria.

No	Medios de cultivo utilizados
1	MS + 0.25 mg/L BAP + 0.05 mg/l AIA
2	MS + 1.0 mg/L BAP + 0.05 mg/l AIA
3	MS + 1.5 mg/L BAP + 0.05 mg/l AIA
4	MS + 2.0 mg/l BAP + 0.05 mg/l AIA

Se realizaron dos subcultivos y las evaluaciones se efectuaron a los 30 días teniendo en cuenta las variables: porcentaje de regeneración, número de brotes mayores de 1 cm (NB) y número de explantes totales (ET). Los datos (NB y ET) se sometieron a un análisis de varianza bifactorial (medio de cultivo x subcultivo) con un diseño completamente aleatorizado con 12 repeticiones.

RESULTADOS Y DISCUSION

La desinfección con alcohol y bicloruro en todas las variantes analizadas fue efectiva ya que no se presentaron contaminaciones en las semillas germinadas *in vitro*, por lo que se recomienda la utilización de alcohol durante dos minutos y el tiempo menor de exposición al bicloruro de mercurio que fue de 5 minutos. Estos resultados coinciden con los obtenidos en la desinfección de semillas de pimiento por Rodríguez Manzano y col., 2005.

Al evaluar los porcentajes de regeneración de los brotes (Fig. 1), se pudo detectar que el mejor medio de cultivo fue el M4 (MS + 2 BAP y 0.05 AIA), ya que se obtuvo un 86.5 y un 95.7 % de regeneración en los subcultivos 1 y 2 respectivamente. Se puede apreciar que el porcentaje de regeneración aumentó respecto al número de subcultivos, no así con el resto de los medios de cultivo, donde en todos los casos existió una reducción del porcentaje de regeneración de brotes (Fig. 1).

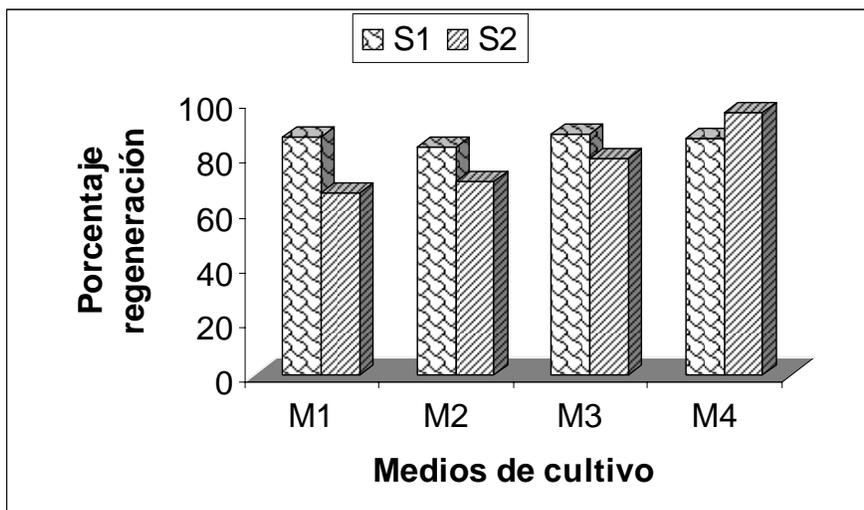


Fig. 1. Porcentaje de regeneración a partir ápices y nudos de zanahoria. M1: MS + 0.25 mg/L BAP + 0.05 mg/l AIA; **M2:** MS + 1.0 mg/L BAP + 0.05 mg/l AIA; **M3:** MS + 1.5 mg/L BAP + 0.05 mg/l AIA; **M4:** MS + 2.0 mg/l BAP + 0.05 mg/l AIA; **S1:** subcultivo 1; **S2:** Subcultivo 2

Al evaluar el número de brotes mayores de 1 cm (Fig. 2 y 3), se puede apreciar como en el medio M4 existió un aumento del número de brotes por subcultivo, aspecto positivo en la micropropagación *in vitro* (Sandoval, 1991).



Fig. 2. Proliferación *in vitro* a partir de ápices y nudos de zanahoria.

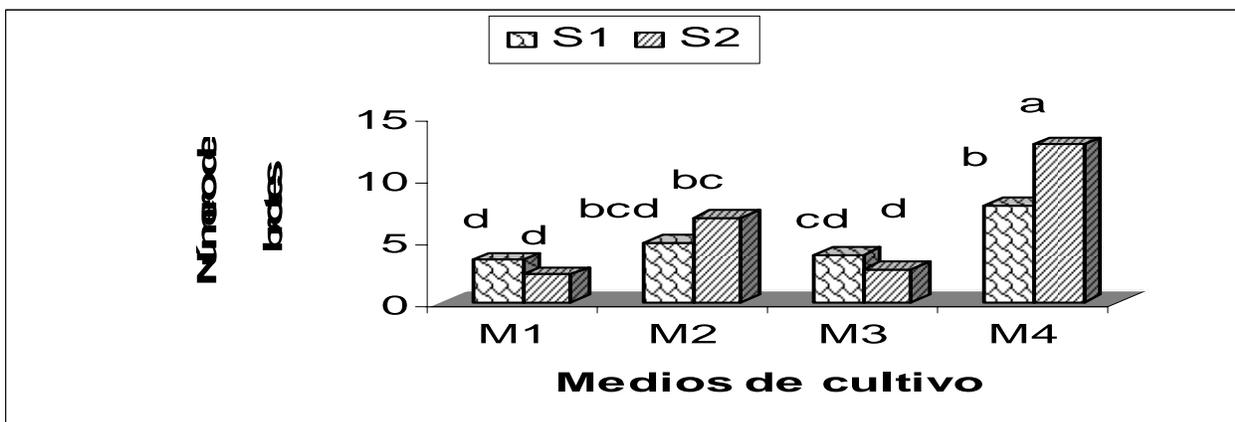


Fig. 3. Número de brotes mayores de 1 cm obtenidos a partir ápices y nudos de zanahoria. M1: MS + 0.25 mg/L BAP + 0.05 mg/l AIA; **M2:** MS + 1.0 mg/L BAP + 0.05 mg/l AIA; **M3:** MS + 1.5 mg/L BAP + 0.05 mg/l AIA; **M4:** MS + 2.0 mg/l BAP + 0.05 mg/l AIA; **S1:** subcultivo 1; **S2:** Subcultivo 2.

A partir del número total de brotes obtenidos se procedió a su segmentación en explantes de 0,5 mm de longitud y esto permitió conocer que aunque los medios M1, M2 y M4 en el primer subcultivo no presentaron diferencias significativas, si el valor mayor se presentó en el medio M4 con un total de 4, 75 explantes como promedio (Fig.4). Al analizar el segundo

subcultivo si se observó que el número de explantes fue mayor en el medio M4, teniendo diferencias significativas con el resto de los medios empleados.

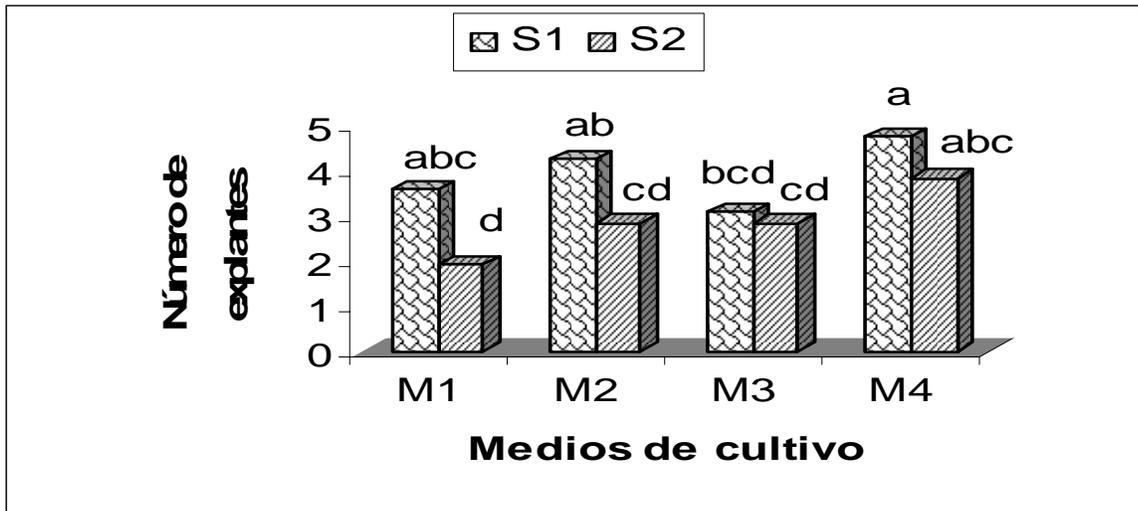


Fig. 4. Número de explantes totales obtenidos a partir ápices y nudos de zanahoria. M1: MS + 0.25 mg/L BAP + 0.05 mg/l AIA; **M2:** MS + 1.0 mg/L BAP + 0.05 mg/l AIA; **M3:** MS + 1.5 mg/L BAP + 0.05 mg/l AIA; **M4:** MS + 2.0 mg/l BAP + 0.05 mg/l AIA; **S1:** subcultivo 1; **S2:** Subcultivo 2.

Después de este proceso de propagación los brotes con y sin raíces se transplantaron a condiciones de organopónico (Fig. 5). La presencia o no de las raíces no determina el desarrollo de la planta así como su tuberización, más bien lo determinante es el tamaño del brote al momento del transplante, observándose que con un tamaño de 5 cm fue más efectivo. Se detectaron algunas bifurcaciones en las raíces (Fig. 6), por lo que se requieren estudios más profundos en épocas favorables para descartar que sea una variación epigenética o una variación de origen genético. Las vitroplantas al cabo de los tres meses de sembradas en el organopónico emitieron inflorescencias (Fig. 7) y se logro la obtención de semilla botánica.



Fig. 5. Vitroplantas crecidas en condiciones de organopónico.



Fig. 6. Raíz con bifurcación proveniente de vitroplantas sembradas en organopónico.



Fig. 7. Inflorescencias obtenidas a partir de las vitroplantas sembradas en el organopónico

CONCLUSIONES

- La desinfección empleada para el establecimiento de semillas fue con alcohol y bicloruro de mercurio durante dos y cinco minutos respectivamente.
- El mejor medio de cultivo para la propagación *in vitro* a partir de ápices y nudos fue el MS suplementado con 2 mg/l de BAP y 0.05 mg/L de AIA.
- La adaptación de las vitroplantas se realizó en condiciones de organopónico, donde la presencia o no de raíces no determina el éxito en el transplante, más bien el tamaño del brote donde se obtuvieron los mejores resultados con un tamaño aproximado de 5 cm.
- Se logró la emisión de inflorescencias y la obtención de semilla botánica a partir de las vitroplantas sembradas en el organopónico.

REFERENCIAS

- Capote A et al. (2000):** Estudio de la variabilidad inducida en células y plántulas de cebolla (*Allium cepa* L.) cv. Caribe – 71 regeneradas *in vitro*. Revista Biotecnología Aplicada; (17): 241 – 246.
- Capote A et al. (2003):** Comportamiento *in vitro* de cultivares seleccionados de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). II. Estudio de la callogénesis y rizogénesis espontánea. Revista Jardín Botánico Nacional, 24 (1-2): 219 – 225.

- Capote A et al. (2004):** Selección *in vitro* y caracterización de líneas de tomate resistentes a *Alternaria solani*..(Publicación electrónica Memorias del II Congreso de Agricultura Tropical, TROPICO' 2004, C. Habana (Abril/ 04) ISBN 959- 7147- 02- 6.
- Pardo, J. A. Cultivo de la zanahoria. Vida rural nº 89, Junio de 1999.**
- Rodríguez-Manzano, A., Servelio Quintero, Ana Julia Rodríguez y Zoila Fundora. 2003.** Establecimiento *in vitro* de ápices de malanga *Xanthosoma sagittifolium*. Revista Cultivos Tropicales. Vol 24 (3), 5-8.
- Rodríguez Manzano, A, A. Capote y D. Pérez. 2005.** Cultivo *in vitro* y regeneración directa a partir de hojas en *Capsicum annum*.X Jornada Científica INIFAT, Abril.
- Rodríguez Nodals, A., A. Rodríguez Manzano, A. Sánchez Iglesias, A. Prats Pérez, Arlene Rodríguez Manzano, J. Fresneda Buides, M. I. Benítez Alzola, M. Carrión Ramírez, N. Fraga Aguirre, O. Barrios Govín, R. Avilés Pacheco, S. Quintero Fernández, T. H. Chavéz Rojas, Laura Muñoz De Con. 2002.** Producción de propágulos en las raíces tuberosas y rizomas. Manual Técnico para la Producción de Semillas en la Agricultura Urbana. II. Hortalizas y Propágulos. INIFAT- GNAU- PNUD, 68-80, La Habana.
- Sandoval, J. A.** 1991. Micropropgación de plátano y banano (Musa AAB, AAA) en el CATIE. Turrialba, Costa Rica. 24p.
- Vidal Vieira, J., P. Silva Ritschel, J. M. Charchar, M. Moreira Lana, D.B. Lima, C. A. López y A. Williams Moita. Alvorada. 2003.** EMBRAPA. Ministerio de la Agricultura. Brasilia,.