

**UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
FACULTAD DE AGRONOMIA**

**CULTIVO IN VITRO DE CEBOLLA (ALLIUM CEPA L) A PARTIR
DE DISCOS BASALES**

por

Liliana María MALUTIN CARBALLO

**TESIS presentada como
uno de los requisitos
para obtener el título de
Ingeniero Agrónomo**

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2010**

Tesis aprobada por:

Director:

Ing. Agr. Guillermo Galván (Phd)

Ing. Agr. Silvia Ross (MSc)

Ing. Agr. Alicia Castillo (MSc)

Fecha:

Autor:

Liliana María Malutin Carballo

AGRADECIMIENTOS

Por la colaboración prestada para que fuese posible la realización de esta tesis quisiera agradecer a las siguientes personas e instituciones:

- A Nico, mi gran compañero de ruta, que siempre me apoyó y me ayudó en esta carrera.
- A mi familia, especialmente a Silvia por estimularme y apoyarme incondicionalmente.
- A Ing. Agr. Guillermo Galván (Phd), por todo su apoyo, por ser un guía y un ejemplo en lo profesional y personal, mil gracias por todo. Director y supervisor de este trabajo.
- A la Ing. Agr. Silvia Ross (MSc), por todo su apoyo, su valiosa colaboración y su paciencia en esta tesis. Directora y supervisora de este trabajo.
- A la Ing. Agr. Alicia Castillo (MSc) por su aporte.
- Al personal del Laboratorio de micropropagación vegetal de la Cátedra de Fisiología Vegetal de la Facultad de Agronomía, por su gran colaboración.
- Al personal de la Cátedra de Horticultura de la Facultad de Agronomía, por su colaboración.
- Al personal de Biblioteca de la Facultad de Agronomía, gracias Sully.
- Al Ing. Agr. Santiago Dogliotti (Phd), por apoyarme y guiarme en la carrera.
- Al Ing. Agr. Gustavo Uriarte por todos sus consejos.
- A todos mis compañeros y amigos que fui ganando en el transcurso de esta hermosa carrera, muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VII
1. <u>INTRODUCCION</u>	1
1.1. EL CULTIVO DE CEBOLLA EN EL URUGUAY.....	1
1.2. ASPECTOS BOTÁNICOS Y FISIOLÓGICOS DE LA CEBOLLA.....	2
1.3. ANDROESTERILIDAD DE LA CEBOLLA.....	5
1.4. UTILIZACION DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE CEBOLLA.....	6
1.5. OBJETIVOS.....	7
2. <u>REVISION BIBLIOGRÁFICA</u>	8
2.1. CULTIVO <i>IN VITRO</i>	8
2.1.1. <u>Introducción</u>	8
2.1.2. <u>Historia del cultivo <i>in vitro</i></u>	8
2.1.3. <u>Micropropagación</u>	9
2.1.4. <u>Limpieza de virus y otras enfermedades</u>	11
2.1.5. <u>Mantenimiento de colecciones de germoplasma</u>	11
2.1.6. <u>Mejoramiento genético</u>	13
2.2. APLICACIONES DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE CEBOLLA..	13
2.3. METODOLOGÍA DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE CEBOLLA.....	14
2.3.1. <u>Técnicas de desinfección y explantos utilizados en el cultivo <i>in vitro</i> en cebolla</u>	15

2.3.2.	<u>Reguladores del crecimiento evaluados en el medio de cultivo de cebolla.....</u>	16
3.	<u>MATERIALES Y METODOS.....</u>	23
3.1.	MATERIAL VEGETAL.....	23
3.2.	TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES.....	23
3.2.1.	<u>Experimento 1. Efecto de diferentes tiempos de desinfección.....</u>	23
3.2.2.	<u>Experimento 2. Efecto de la combinación de diferentes reguladores de crecimiento.....</u>	28
3.3.	EVALUACIONES REALIZADAS.....	29
3.3.1.	<u>Evaluación del efecto de diferentes tiempos de desinfección.....</u>	29
3.3.2.	<u>Evaluación del efecto de los reguladores de crecimiento.....</u>	30
3.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	31
4.	<u>RESULTADOS.....</u>	32
4.1.	EFFECTO DE DIFERENTES TIEMPOS DE DESINFECCIÓN.....	32
4.2.	EVALUACIÓN DEL EFECTO DE DIFERENTES REGULADORES DE CRECIMIENTO.....	40
5.	<u>DISCUSIÓN.....</u>	45
5.1.	DIFERENTES TIEMPOS DE DESINFECCIÓN.....	45
5.2.	EFFECTO DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO.....	47
6.	<u>CONCLUSIONES.....</u>	51
7.	<u>RESUMEN.....</u>	53
8.	<u>SUMMARY.....</u>	55

9. BIBLIOGRAFÍA..... 57

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.		Página
1.	Características de algunos cultivares de cebollas desarrolladas a partir del germoplasma local.....	2
2.	Estados cronológicos de crecimiento de la cebolla definidos por Voss (1979).....	5
3.	Composición de los medios de cultivo empleados para la obtención de callos y para la regeneración de plantas de cebolla a partir de éstos.....	21
4.	Composición de los medios de cultivo utilizados para la regeneración de plantas.....	22
5.	Composición de minerales y vitaminas para la preparación del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962).....	26
6.	Fecha, números y tipos de explantos de los ensayos realizados para el estudio del efecto de diferentes tiempos de desinfección, según cultivar.....	29
7.	Fechas, números y tipos de explantos utilizados para evaluar los efectos de los reguladores de crecimiento en la población local "Siete Cascaras".....	30
8.	Contrastes entre tratamientos de hormonas.....	31
9.	Número de plantas sanas y contaminadas según variedad y tipo de explanto.....	34
10.	Plantas verdes que brotaron y de plantas muertas, según tipo de explanto y cultivar.....	36
11.	Proporción de plantas brotadas y muertas, según tratamiento (tiempo de desinfección) y tipo de explanto (entero o dividido).....	37

12.	Longitud de hoja y de raíz de las plantas repicadas en medio MS con diferentes reguladores del crecimiento y concentraciones, para cada experimento.....	41
13.	Probabilidad de error asociada a los contrastes entre tratamientos de hormonas.....	44
14.	Análisis de varianza de los tratamientos.....	44

Figura No.

1.	Representación esquemática de una planta de cebolla en la etapa de expansión de las hojas, previo al inicio de la bulbificación (adaptado de Jones y Mann, por Dogliotti y Galván 2009).....	3
2.	Las concentraciones relativas de auxina y citoquinina que suelen ser necesarios para el crecimiento y la morfogénesis (George 1984).....	18
3.	Plantas de los cultivares “Summit” y “Takstar” creciendo en macetas en el invernáculo de la Facultad de Agronomía.....	25
4.	Modo de preparación de explantos. a) Disco basal a partir de una planta cultivada en invernáculo. b) Corte en dos secciones del disco basal. c) Modo de preparación de explantos para introducir <i>in vitro</i> a partir de bulbos crecidos en canteros a campo. d) Modo de preparación de explantos a partir de plantas <i>in vitro</i> y de plantas jóvenes crecidas en invernáculo, divididos en cuatro secciones.....	27
5.	Tubos con explantos introducidos a partir de discos basales contaminados por microorganismos, tanto hongos como bacterias.....	33
6.	Porcentaje de plantas sanas y contaminadas, según tratamiento y cultivar.....	35

7.	Porcentaje de plantas verdes y brotadas para cada tratamiento de desinfección y cada cultivar de cebolla.....	37
8.	Porcentaje de plantas muertas, según tipo de explanto y cultivar.....	38
9.	Foto de tratamientos de desinfección visualizando plantas verdes y plantas muertas por oxidación, (A) tratamiento de 30 minutos con plantas verdes, (B) tratamiento de 60 minutos y (C) tratamiento de 90 minutos con plantas muertas oxidadas.....	39
10.	Longitud promedio de hojas y raíces según tratamientos con diferentes reguladores del crecimiento y concentraciones en el medio de cultivo. Los datos son promedio de los experimentos A, B y C.....	42
11.	Fotos de los explantos de cebolla en los tratamientos con diferentes tipo de reguladores de crecimiento y concentraciones agregados al medio de cultivo MS: (A) tratamiento control, (B) tratamiento 2 mg.l ⁻¹ BAP, (C) tratamiento 4 mg.l ⁻¹ BAP, (D) tratamiento 2 mg.l ⁻¹ 2iP, (E) tratamiento 4 mg.l ⁻¹ 2iP.....	43

1. INTRODUCCION

1.1. EL CULTIVO DE CEBOLLA EN EL URUGUAY

El cultivo de cebolla se constituye como el tercer rubro hortícola en volumen de producción, segundo en número de productores involucrados y el cuarto en superficie entre los rubros hortícolas plantados en nuestro país (sin incluir la papa). La superficie cultivada en Uruguay es de 1.647 ha, con rendimientos promedios de 13.000 kg por ha y una producción total de 19.564 mil toneladas (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2008).

Es un rubro tradicional, intensivo en dedicación de mano de obra, principalmente de origen familiar. La producción se localiza en dos regiones, la zona sur, con una superficie de 1.326 ha y rendimientos del orden de los 11.100 kg, que ocupa el 81 % del área implantada total en el país (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2008). En esta zona, predominan los cultivares de día largo y medio, con buena conservación. La zona norte (fundamentalmente los departamentos de Artigas y Salto) ocupa una superficie de 321 ha (19% del área total), con rendimientos de 15.000 kg. Allí predominan los cultivares de día corto (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2008).

Es una especie de polinización cruzada, multiplicada en forma de polinización abierta y en menor proporción en base a híbridos (F1). En el país no se ha demostrado ventaja significativa que justifique el desarrollo de híbridos por lo que se optó por desarrollar variedades de polinización abierta (Vilaró et al., 2005). El mejoramiento local se ha justificado con el desarrollo de cultivares adaptados a nuestras condiciones específicas (Galván, 2005b).

El mejoramiento genético que ha hecho uso del germoplasma local ha permitido el aprovechamiento de la adaptación de materiales locales y su mantenimiento en uso. En los trabajos de mejoramiento en la cebolla se ha hecho uso del germoplasma local dando lugar a varios cultivares (cuadro 1) principalmente los trabajos desarrollados por el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) y por el Centro Regional Sur (CRS) de la Facultad de Agronomía (Galván et al., 2005a). Cultivares desarrollados en los programas nacionales han alcanzado amplia difusión, como INIA Casera y

Pantanoso del Sauce CRS, que ocupan 50 % del área cultivada en el litoral norte y en el sur (URUGUAY. MGAP. DIEA, 2008).

Cuadro 1. Características de algunos cultivares de cebollas desarrolladas a partir del germoplasma local.

Cultivar	Cultivo	Calidad	Conservación
INIA Casera	Precoz – Semiprecoz Resistencia parcial a <i>Botrytis</i>	Color Bronceado claro Forma Trompo-globosa	5 meses
INIA Colorada	Semiprecoz Resistencia parcial a <i>Botrytis</i> y <i>Peronospora</i>	Color rojo púrpura, Forma globo-achatada	4 meses
Pantanoso del Sauce CRS	Ciclo intermedio Resistencia parcial a <i>Botrytis</i>	Color bronceado Forma globosa	7 meses
INIA Valenciana	Tardía Resistencia parcial a <i>Peronospora</i>	Color marrón Forma globosa	6 meses

Fuente: elaborado en base a Vilaró et al. (2005).

1.2. ASPECTOS BOTANICOS Y FISIOLÓGICOS DE LA CEBOLLA

La cebolla pertenece a la familia de las Liliáceas, género *Allium*, sección *Cepa*. Es de ciclo bianual, para su utilización comercial de bulbo se planta como anual. El tipo de reproducción de la especie es de fecundación cruzada (alógama) y entomófila (Arboleya et al., 2005).

El tallo de la planta de cebolla es un disco basal que se encuentra por debajo de la superficie del suelo. En la parte superior y central de este disco se encuentra el meristemo apical, donde se inicia el crecimiento de las nuevas hojas, en forma opuesta y alternada, de tal manera que las hojas emergen en dos filas a 180° una de otra. Las hojas tienen dos partes bien diferenciadas: la vaina y la lámina. Las vainas de las hojas son circulares, rodean completamente

el punto de crecimiento formando un tubo que se proyecta desde el tallo y encierra en su interior a las hojas más jóvenes. Toda esta estructura formada por las vainas de las hojas se denomina 'falso tallo' (figura 1). En la unión de la vaina y lámina de la hoja hay una abertura por la cual sale la lámina de la siguiente hoja. La lámina es un tubo hueco cerrado en la punta, ligeramente achatado en su cara superior. Posee un bulbo tunicado con tallos erguidos subterráneos, hojas redondas y acanaladas, con flores actinomorfas hermafroditas. Las hojas inferiores o catafilos se encuentran siempre en las partes inferiores subterráneas (bulbos, rizomas) en formas de escamas y casi nunca tienen coloración verde. La cebolla está formada por catafilos. Presenta raíz fasciculada o fibrosa, carece de raíz principal. Las raicillas salen del mismo sitio dando el aspecto de una cabellera (Dogliotti y Galván, 2009) (figura 1).

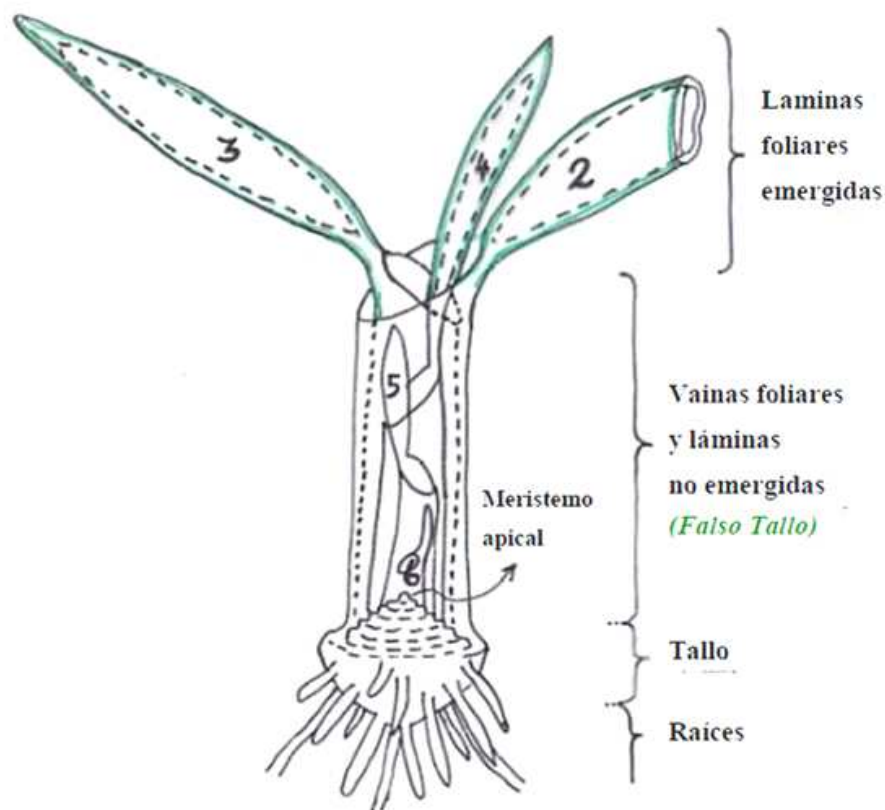


Figura 1. Representación esquemática de una planta de cebolla en la etapa de expansión de las hojas, previo al inicio de la bulbificación (adaptado de Jones y Mann, por Dogliotti y Galván, 2009).

La cebolla es sembrada en otoño. En la primer etapa se da crecimiento y desarrollo foliar, hasta el momento en que se alcanza el fotoperíodo crítico y cesa el desarrollo vegetativo, a partir de aquí comienza la bulbificación. En el momento de inicio de la bulbificación, en general la planta presenta entre 7 y 10 hojas verdaderas expandidas. La bulbificación de la cebolla depende fundamentalmente de dos factores ambientales: el fotoperíodo y la temperatura. Se requiere alcanzar un fotoperíodo mínimo por encima del cual la cebolla bulbificará. Una vez alcanzado ese umbral fotoperiódico, la temperatura jugará un papel fundamental en la tasa de crecimiento del bulbo (Brewster, citado por Arboleya et al., 2005). El balance entre el crecimiento de la parte aérea y el inicio de la bulbificación es un factor crítico para la determinación del rendimiento de bulbos, dado que el tamaño de los mismos dependerá del área foliar formada en el momento que comienza a bulbificar (Arbeletche et al., 1999) (cuadro 2).

Los cultivares se distinguen por el fotoperíodo mínimo crítico que induce la formación de los bulbos. Se clasifican según la respuesta en tres grupos: día corto, día medio y día largo. Para un fotoperíodo dado, la bulbificación será más rápida cuanto mayor sea la temperatura. Luego de la cosecha (primer año del ciclo) el bulbo entra en dormición fisiológica (endodormición), cuando el bulbo levanta este estado de latencia, aún no se da la brotación ya que entra en ecodormición hasta los meses de junio-julio donde acumula unidades de frío para levantar este estado (Arboleya et al., 2005).

Cuadro 2. Estados cronológicos de crecimiento de la cebolla definidos por Voss (1979).

Estado de crecimiento	Días después de la siembra
1 – Semilla	0
2 – emergencia de la radícula	10 a 15
3 – estado de bastón o estado de codo	15 a 30
4 – estado de bandera	30 a 40
5 – estado de 1 a 2 hojas verdaderas	40 a 50
6 – estado de 3 a 4 hojas verdaderas	50 a 70
7 – bulbificación visible	70 a 90
8 – comienzo del estado de maduración	130 a 160
9 – estado de maduración completa	150 a 180

Fuente: Arboleya et al. (2005)

1.3. ANDROESTERILIDAD DE LA CEBOLLA

La androesterilidad ocurre naturalmente en variedades de cebolla (Pathak, 1997). Fue descubierta por primera vez en California en la variedad Italian Red (Jones y Emsweller, 1937). En la medida que la androesterilidad asegura que una planta no funciona como parental masculino, sino solamente femenino, ha sido la base para el desarrollo de híbridos de cebolla que predominan en los países desarrollados como material de siembra (Shygio y Kik, 2007).

En poblaciones locales de cebolla en Uruguay se han identificado plantas androestériles durante el desarrollo de líneas endocriadas en el programa de mejoramiento en Facultad de Agronomía. La frecuencia fue de 1 a 3 % para distintas poblaciones (Galván y Sollier, 1994).

La androesterilidad facilita la realización de cruzamientos dirigidos, de utilidad práctica para el mejoramiento. En particular, líneas androestériles se han utilizado para la realización de cruzamientos interespecíficos que son de muy baja tasa de éxito (Khrustaleva y Kik, 1998). Los cruzamientos dirigidos,

además, posibilitan la generación de poblaciones segregantes con las cuales analizar la base genética de caracteres agronómicos mediante marcadores moleculares.

Para el mantenimiento y la multiplicación de plantas androestériles, la introducción *in vitro* y su micropropagación es un método apropiado. La multiplicación clonal *in vitro* ha sido utilizada en *Allium*, por ejemplo, para lograr repeticiones para el fenotipado de poblaciones segregantes (De Melo, 2003b). Asimismo, el cultivo *in vitro* se ha utilizado para la producción de dobles haploides (Gremmingen et al. 1996, Bohanec 2002).

1.4. UTILIZACIÓN DEL CULTIVO *IN VITRO* EN CEBOLLA

La propagación *in vitro* permite la regeneración de plantas de un genotipo deseable en condiciones asépticas. Se utiliza con el objetivo de producir plantas libres de enfermedades, lograr la propagación clonal, la conservación de germoplasma, el rescate de híbridos interespecíficos estériles y la transformación genética (Eady, citado por Quintana y Robledo, 2005). Uno de los fines por los cuales las técnicas de cultivo de tejidos han sido ampliamente utilizadas en muchas especies es la finalidad de proveer una vía de propagación que facilite la multiplicación y el mantenimiento de genotipos de interés (Capote, 1996).

En cebolla se han realizado numerosos trabajos a fin de obtener multiplicación clonal con una elevada tasa de multiplicación a partir de diferentes explantos (Hussey, Hussey y Falavigna, Philips y Hubstenberger, Pike y Yoo, citados por Capote, 1996). También se analizó el efecto de distintas combinaciones hormonales (Dustan y Short, Phillips y Luteyn, Havel y Novak, Kahane et al., citados por Capote, 1996), así como las diferencias entre genotipos para la introducción y multiplicación *in vitro* (Phillips y Hubstenberger, Van der Walk et al., citados por Capote, 1996) (Capote, 1996).

Según Quintana y Robledo (2005), la regeneración *in vitro* de cebolla se ha practicado vía organogénesis (Kamstaityte y Stanys, citados por Quintana y Robledo, 2005) y embriogénesis somática (Saber, Zheng et al., Tanikawa et al., citados por Quintana y Robledo, 2005), empleando distintas partes de la plantas como explanto. La frecuencia de regeneración ha sido baja (de 1 a 6 plantas

por explanto). Sin embargo, el cultivo de ápices del disco basal puede considerarse como una opción en el establecimiento de protocolos de multiplicación *in vitro* de cebolla, pues tales ápices pueden obtenerse fácilmente de plántulas y de bulbos de plantas adultas.

1.5. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue ajustar un protocolo de multiplicación para la introducción y multiplicación *in vitro* de genotipos de cebolla, que garantice una rápida multiplicación y facilite su conservación, con vistas a su utilización en programas de mejoramiento.

Para ello se, planteó como objetivos específicos:

- evaluar diferentes tratamientos de desinfección para ajustar la metodología de introducción *in vitro*.
- evaluar el efecto de la combinación de diferentes reguladores de crecimiento (6-bencil amino purina, BAP; 6 γ , γ -dimetilalilamino purina, 2iP y ácido naftalen acético, ANA) suplementados al medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962).

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. CULTIVO *IN VITRO*

2.1.1. Introducción

El concepto de cultivo de tejidos o propagación *in vitro* (del latín, en vidrio) abarca tanto el cultivo aséptico de tejidos como de células y órganos. Esta técnica consiste en cultivar un inóculo con potencialidad de diferenciación bajo condiciones asépticas en presencia de un balance de nutrientes y hormonas (Abdelnour, 1994). Las técnicas de cultivos asépticos han contribuido no solo a un mejor entendimiento de los sucesos de la diferenciación celular, sino a una mejor utilización de tales sucesos para la conveniencia y utilización más eficiente de las plantas (González, 1996).

La técnica del cultivo *in vitro* tiene diferentes usos, algunos de los principales, que detallaremos seguidamente, son: (a) micropropagación; (b) obtención de plantas libres de virus y otros patógenos; (c) conservación de germoplasma; y (d) mejoramiento genético.

2.1.2. Historia del cultivo *in vitro*

La historia del cultivo *in vitro* comienza cuando Schwann y Schleiden en 1838, citados por Pierik (1987), formularon la llamada teoría de la totipotencia, que indica que las células son autónomas y, en principio, son capaces de regenerar y originar una planta completa. En esta teoría es la que fundamenta el principio de las células de la planta y del cultivo de tejidos (Pierik, 1987). Los primeros intentos en la metodología de cultivo *in vitro*, fueron realizados por Sacks y Knops, citados por González (1996), quienes observaron que los principales nutrientes de plantas superiores eran sustancias inorgánicas, y prepararon una solución nutritiva que ha sido utilizada desde entonces. Fue el origen del medio de cultivo (González, 1996).

Hacia 1902, Haberlandt, citado por Lago et al. (1997), realizó las primeras experiencias en cultivo *in vitro* y logró mantener vivo el primer cultivo de células vegetales en un medio nutritivo estéril. Esto fue posible partiendo de la base de que todas las células tienen la capacidad de expresar la totipotencia

celular, donde se reconstituye un individuo por vía asexual a partir de una célula o de un pequeño número de células (Lago et al., 1997).

Posteriormente, hacia 1932 Gautheret, Morel y Martín, aportaron progresos considerables a esta técnica; y fue en aumento el conocimiento de los reguladores de crecimiento, en lo que corresponde a sus modos de acción y las adecuadas proporciones en que deben ser utilizados, dando un dominio total de la regeneración de los diversos órganos de la planta (Lago et al., 1997).

2.1.3. Micropropagación

La micropropagación es prácticamente, una multiplicación masiva *in vitro* (Mateo Box, 1988). Se ha definido como “cualquier” procedimiento aséptico que comprenda la manipulación de las plantas, de órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas, y que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente (Roca, 1991). La micropropagación consiste en poner trozos o secciones de tallos, raíces, etc., en un medio de cultivo apropiado y condiciones de asepsia, obteniéndose plantas nuevas, idénticas al material madre en forma muy rápida y eficiente (Mateo Box, 1988).

La micropropagación clonal implica que cada una de las plántulas que se producen pueda crecer y ser fenotípicamente y genotípicamente idéntica a la planta original de la que se deriva (Roca, 1991). Debido a que se refiere a un fenómeno de reproducción asexual, el riesgo de tener “variantes” fenotípicas o genéticas es bajo. Sin embargo eso puede suceder cuando no se domina el proceso *in vitro* (Abdelnour y Escalant, 1994).

Esta técnica ha logrado rápida aceptación en la industria y se está practicando en especies herbáceas tanto hortícolas como ornamentales y aún en especies leñosas (Roca 1991, Abdelnour y Escalant 1994). Existen varias vías generales para realizar la multiplicación clonal; entre ellas están:

a. La multiplicación de brotes de yemas terminales, axilares o laterales. El punto de inicio en este caso puede estar en los meristemas, las puntas de los brotes, las yemas, los nudos o los meristemas de las yemas en raíces.

b. La organogénesis directa. En este caso la formación del brote adventicio o de la raíz ocurre en el explanto de un órgano, o en alguna parte escindida de la planta.

c. La organogénesis indirecta. La formación del brote adventicio o de la raíz ocurre en este caso a partir del callo. El callo se deriva inicialmente de un órgano, tejido u otra parte escindida de la planta.

d. La embriogénesis somática. Los embriones pueden formarse directamente en el explanto primario, o indirectamente de las células cultivadas en suspensión o en un medio semi-sólido a partir de un callo.

e. El micro-injerto.

f. El cultivo de embriones y esporas.

Según Roca (1991), George (1993), en algunas especies esta metodología ha mostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación. Las más importantes son:

- Los cultivos *in vitro* se inician con piezas pequeñas de las plantas (explantos) y pequeños brotes o embriones. Por lo tanto, se puede multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en tiempos económicamente rentables.
- La propagación se lleva a cabo en condiciones asépticas, libres de patógenos. Una vez que ha comenzado la multiplicación *in vitro* no debe haber ninguna pérdida por enfermedad y las plantas producidas al final del período deben estar libres de bacterias, hongos y otros microorganismos. Mayor control sobre la sanidad del material que se propaga.
- La producción puede continuar durante todo el año y es independiente de los cambios estacionales.
- El material vegetal reproducido a menudo puede ser almacenado durante largos periodos.
- Facilidad para transportar el material *in vitro* de un país a otro, con mayor seguridad y menores restricciones sanitarias.
- Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual solo existan pocos individuos, como en el caso de un stock fundación en un programa de mejoramiento.

2.1.4. Limpieza de virus y otras enfermedades

La multiplicación vegetativa, si se repite y emplea como principal método de propagación, favorece la proliferación de virus. Muchos cultivos comerciales vegetales, particularmente los que son propagados vegetativamente, contienen virus sistémicos, los cuales afectan su funcionamiento o disminuyen su rendimiento. Por tanto, antes de liberar comercialmente es deseable producir plantas libres de virus, que pueden ser clonalmente multiplicadas. En muchas especies lo anterior puede lograrse con tratamientos con calor de varios órganos *in vitro*, o de plantas, así como con la aplicación de productos químicos. Sin embargo, ciertos virus han resistido todas las pruebas de erradicación por estos medios y se hacen necesarios otros métodos (Lucas, 2004).

Actualmente la alternativa de más éxito es el cultivo de meristemas apicales, frecuentemente combinado con quimioterapia o con tratamientos de calor. Cuando estos métodos son usados, las plantas no solo son liberadas del virus, sino también de hongos y otros patógenos (Lucas, 2004). El cultivo de meristemas como una técnica para el saneamiento de clones afectados por patógenos, especialmente de virus, se fundamenta en el hecho de que la distribución de los virus en los tejidos de la planta infectada no es uniforme, y su concentración tiende a disminuir progresivamente hacia el meristema apical del tallo (Fernández, 1982).

La técnica del cultivo de meristemas consiste en aislar asépticamente la región meristemática de la yema vegetativa apical o axilar, conjuntamente con uno o dos de los primordios foliares más jóvenes, e implantarla en un medio de cultivo estéril (Fernández, 1982).

2.1.5. Mantenimiento de colecciones de germoplasma

La conservación de plantas es un componente integral de los sistemas de agricultura sostenible y desde la perspectiva del mejoramiento de los cultivos. La conservación de germoplasma valioso se ha considerado de alta prioridad por el Consejo Internacional de los Recursos Fitogenéticos (IBPGR). Se ha estimado que de más de 240.000 especies de angiospermas en el mundo, algo más de 300 se han utilizado en un tiempo u otro para la alimentación humana. Sin embargo, son doce cultivos principalmente los que

proveen a la población mundial de alimento, lo que indica que el hombre depende para su alimentación de unas pocas especies de los miles que hay en el planeta. Como resultado de conocer su importancia, se ha dado gran énfasis a la necesidad de preservar los recursos fitogenéticos como forma de mantener la biodiversidad (Abdelnour y Escalant, 1994).

La extinción de diferentes especies de plantas (por recolección excesiva o por la destrucción y limpieza de sus entornos naturales para fines antrópicos, así como la desaparición y extinción de las variedades más antiguas) puede ser una pérdida irrecuperable para las posibilidades del mejoramiento genético futuro. Las plantas con reproducción sexual se mantienen por largos periodos en forma de semillas en recipientes cerrados o en paquetes herméticos, almacenados a baja temperatura (-18 °C o menos) y baja humedad. Donde a menudo surgen problemas con la germinación de las semillas o cuando las semillas son viables únicamente por periodos cortos, se consideran otros métodos (*in vitro*) de propagación vegetativa como una opción viable de conservación del germoplasma (Pierik, 1987).

El almacenamiento de germoplasma en crecimiento lento es un método viable para mantener grandes colecciones en poco espacio, libres de los riesgos que causan las plagas y enfermedades. El establecimiento de bancos de germoplasma *in vitro* se ha convertido en una contribución importante al mantenimiento convencional, en el campo, de grandes colecciones. Esta actividad facilita principalmente la conservación de los genes y de los genotipos (Roca, 1991).

Hay dos sistemas básicos de conservación del germoplasma *in vitro*, uno mediante la limitación del crecimiento hasta tasas mínimas, y otro mediante la supresión total del crecimiento y del metabolismo celular. La conservación de los recursos fitogenéticos mediante los métodos del cultivo *in vitro* se logra haciendo cambios en el ambiente de cultivo para desacelerar o suprimir totalmente el crecimiento de las células y de los tejidos; el objetivo es aumentar al máximo el período de transferencia del cultivo o extenderlo indefinidamente (Roca, 1991).

Debe realizarse, una evaluación científica cuidadosa de las ventajas y desventajas de una estrategia *in vitro* de la conservación de recursos genéticos para cada caso específico (Roca, 1991). Withers, citado por Pierik (1987), ha publicado una revisión de todos los institutos del mundo en lo que tiene que ver

con el almacenamiento *in vitro* de plantas superiores, y también se examinaron las actividades en este tema que tiene lugar en diferentes países. También enumeró las diferentes plantas que se están estudiando y el problema que se encontró con el almacenamiento *in vitro*.

2.1.6. Mejoramiento genético

Se ha previsto que las aplicaciones de la biotecnología al mejoramiento de las plantas darán lugar a productos revolucionarios. Los beneficios más inmediatos serán aplicaciones que perfeccionen las técnicas ya existentes y que proporcionen apoyo a los programas de mejoramiento (Roca, 1991). La creación de híbridos con las técnicas de hibridación clásicas en el campo puede ser difícil debido a problemas de esterilidad o incompatibilidad de variedades. Algunas de las técnicas del cultivo de tejido pueden ayudar y facilitar la creación de nuevas variedades. Un incremento de la variabilidad natural puede ser logrado usando técnicas como: calogénesis, cultivo de células y el cultivo de protoplastos, asociados o no a técnicas de ingeniería genética (introducción de genes o transformación) (Abdelnour, 1994).

Según Karp, citado por Capote et al. (2000) resulta de gran interés para el mejoramiento genético, el descubrimiento de la alta frecuencia de células cultivadas *in vitro* que muestran mutaciones que se pueden expresar en las plantas regeneradas de forma adventicia, como es el caso de la cebolla (Falavigna y Hussey, citados por Capote et al., 2000). Por esta razón, el cultivo de tejidos y células *in vitro* constituye una alternativa en los programas de mejoramiento genético, puesto que durante este período se generan modificaciones genéticas heredables denominadas variaciones somaclonales (Larkin y Scowcroft, citados por Capote et al., 2000).

2.2. APLICACIONES DEL CULTIVO *IN VITRO* DE CEBOLLA

En la reproducción, especialmente en especies de polinización cruzada, una única semilla representa un genotipo. En los cruzamientos difíciles, como cruzamientos interespecíficos y cruzamientos puente, a menudo se obtienen pocas semillas. Para mantener genotipos valiosos y únicos de una manera confiable, es importante obtener la mayor cantidad posible de explantos de una sola planta. En cebolla, innumerables plantas pueden ser obtenidas de una

misma planta usando discos basales, y los discos basales han probado ser una fuente confiable de explantos. Sin embargo, siempre existe la posibilidad de que un cierto genotipo o especie no se comporta así. *Allium roylei*, por ejemplo, fue considerado de bajo potencial de regeneración, cuando los discos basales fueron utilizados *in vitro* para la multiplicación (De Melo, 2003b).

Las técnicas de cultivo de tejidos han sido ampliamente utilizadas en cebolla con la finalidad de proveer una vía de propagación que facilite la multiplicación y el mantenimiento de genotipos de interés. Se estudiaron los efectos de diferentes reguladores del crecimiento y explantos (Capote 1996, Capote et al. 2000). Según Quintana y Robledo (2005), la regeneración *in vitro* de cebolla también se ha practicado vía organogénesis (Kamstaityle y Stanys, citados por Quintana y Robledo (2005) y embiogenesis somática (Saker Zheng et al., Tanikawa et al., citados por Quintana y Robledo, 2005) empleando distintas partes de la planta como explanto. No obstante, la frecuencia de regeneración ha sido baja (de 1 a 6 plantas por explanto). Quintana y Robledo (2005), tuvo como objetivo desarrollar un sistema de regeneración *in vitro* de variedades de cebolla mediante el cultivo de ápices de raíces.

Rodríguez et al. (1996), estudió la optimización de la metodología para la desinfección de tejidos de bulbos, y evaluó el efecto de la combinación de 6-bencil amino purina (BAP) y ácido naftaleno acético (ANA) en la micropropagación a partir de segmentos basales y de yemas caulinares de bulbos.

2.3. METODOLOGÍA DEL CULTIVO *IN VITRO* DE CEBOLLA

En cebolla se han realizado numerosos trabajos a fin de obtener una elevada tasa de multiplicación, analizándose para ello el efecto de diferentes explantos, combinaciones hormonales y de genotipos.

Las metodologías utilizadas en el cultivo *in vitro* de cebolla, son varias dependiendo de los objetivos del autor, llevando a esto la utilización de diferentes orígenes de explantos para dichos estudios según los objetivos de cada autor. Se han utilizado yemas enteras y yemas divididas longitudinalmente (Capote, 1996), semillas (Mohamed et al. 1993, Quintana y Robledo 2005), discos basales enteros o divididos (Rodríguez et al., 1996), flores (De Melo,

2003b) y segmentos de hojas inmaduras para la formación de callos (Capote et al., 2000).

2.3.1. Técnicas de desinfección y explantos utilizados en cebolla

Los métodos de desinfección utilizados y evaluados en los diferentes trabajos varían según cada autor y con los diferentes explantos utilizados para la introducción; por ejemplo discos basales de bulbos (Kil Sun Yoo 1990, Capote 1996, Rodríguez et al. 1996, De Melo 2003b), semillas (Mohamed et al. 1993, Quintana y Robledo 2005) y segmentos de hojas inmaduras (Capote et al., 2000) entre otros.

En todos los trabajos la desinfección comienza con el lavado del material con detergente comercial y abundante agua corriente, luego sumergen el material en etanol 70 %, algunos autores por diez minutos (Capote 1996, Capote et al. 2000) y otros por un minuto (Kil Sun Yoo 1990, Mohamed et al. 1993). Posteriormente, el material vegetal se enjuaga con agua destilada estéril y se sumerge en hipoclorito de sodio (NaOCl), las concentraciones del desinfectante mencionado que se encontraron en la bibliografía están en el rango de 0.3 % (Mohamed et al., 1993) a 5% (Kil Sun Yoo 1990, Capote 1996, Capote et al. 2000). La duración de la inmersión varía entre dos minutos y tres horas, según cada autor: Kil Sun Yoo (1990) por 2 minutos; Mohamed et al. (1993) por 10 minutos; Capote (1996), Capote et al. (2000), Quintana y Robledo (2005) por 20 minutos. Finalmente, este material se enjuaga tres veces con agua estéril previamente destilada (Capote 1996, Mohamed et al. 1997, Capote et al. 2000, Quintana y Robledo 2005); Kil Sun Yoo (1990) sumergió en agua destilada esterilizada por 5 minutos.

Luego de la desinfección, el material vegetal se introduce en tubos de ensayo con medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) donde la gran mayoría utiliza el 100 % de los minerales salvo Capote (1996), que utiliza las sales minerales diluidas en un 50%, el medio también posee 30 gr.l⁻¹ de sacarosa y 7 gr.l⁻¹ de agar, ajustándose el pH a 5,7.

Quintana y Robledo. (2005) utilizó como explanto semillas, donde fueron sumergidas en una solución conteniendo 1 gr/litro Fungimycin 100 (18.1% (p/v) estreptomycin y 2.0% (p/v) oxitetraciclina) durante 15 horas.

Luego se sumergieron en una solución de 1.8% de hipoclorito de sodio durante 20 minutos. Posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Rodríguez et al. (1996) evaluaron diferentes métodos de desinfección. Utilizaron discos basales de cebolla, que fueron lavados con agua corriente y detergente por 30 minutos, luego fueron sumergidos en una solución detergente comercial por 30 minutos; luego se sumergieron por 2 a 3 horas, en solución conteniendo 2.0 gr.l^{-1} del principio activo Benomil. Posteriormente, se probaron diferentes soluciones de inmersión en agua con hipoclorito de sodio (2% NaOCl), A) con un pH 11.5 en diferentes tiempos 1:00, 1:30, 2:00, 2:30 y 3:00 horas; y B) con un pH 6.0 en diferentes tiempos 0:30, 1:00, 1:30, 2:00 y 2:30 horas. Finalmente, se enjuagaron tres veces con agua destilada y esterilizada. Los resultados del trabajo concluyeron la ocurrencia de una contaminación más alta en los tratamientos que se utilizó un pH 11.5 en el hipoclorito en comparación con el pH 6.0. En los tratamientos que se sumergía por 2:00, 2:30 y 3:00 horas en hipoclorito se verificaron daños en los tejidos. Concluyeron también que la reducción del pH de 11.5 a 6.0 fue más eficiente en el control de la contaminación bacteriana. Los mejores resultados se observaron en la utilización de pH 6.0 con un periodo de inmersión de 1:30 horas obteniendo los menores porcentajes de contaminación (12.5%) en dicho trabajo.

2.3.2. Reguladores del crecimiento evaluados en el medio de cultivo de cebolla

Las hormonas vegetales son capaces de regular de manera predominante los fenómenos fisiológicos de las plantas y se producen en pequeñas cantidades en tejidos vegetales. Pueden actuar en el propio tejido donde se generan o bien a largas distancias, mediante transporte a través de los vasos xilemáticos y floemáticos. Las hormonas vegetales controlan un gran número de procesos, entre ellos el crecimiento de las plantas, la caída de las hojas, la floración, la formación del fruto y la germinación. Una fitohormona (hormona vegetal) interviene en varios procesos, y del mismo modo todo proceso está regulado por la acción de varias hormonas. Se establecen fenómenos de antagonismo y balance hormonal que conducen a una regulación precisa de las funciones vegetales (Montaldi, 1995).

Para que se refleje la respuesta a una concentración de hormona se deben dar tres procesos. En primer lugar, la hormona debe encontrarse en

cantidades suficientes en las células adecuadas; en segundo lugar, la hormona debe ser reconocida y capturada por cada uno de los grupos de células que responden a ella (las células blanco); y en tercer lugar, la proteína receptora debe causar algún otro cambio metabólico que conduzca a la amplificación de la señal o el mensajero hormonales. Es de esperar, incluso en un solo tejido de una especie dada, que los cambios durante el desarrollo se acompañen de un cambio no sólo en la concentración hormonal, sino también en la frecuencia o disponibilidad de las proteínas receptoras y en la capacidad de amplificar la señal hormonal. Otras partes de la planta o de una especie diferente pueden responder de manera distintas (Salisbury y Ross, 1994).

Skoog y Miller, citados por George (1993) en 1957 encontraron que la formación de brotes podría ser inducida a partir de callos de tabaco con niveles relativamente bajos de auxinas y niveles altos de citoquininas en el medio de cultivo. Desde este descubrimiento, se ha encontrado que muchos de los aspectos de la diferenciación celular y la organogénesis de tejidos y cultivos de órganos pueden ser controlados por una interacción entre las concentraciones de citoquininas y auxinas; y el equilibrio de estos dos reguladores del crecimiento que normalmente se requiere para iniciar el crecimiento o la diferenciación en cultivos de tejidos (figura 2) (George, 1993).

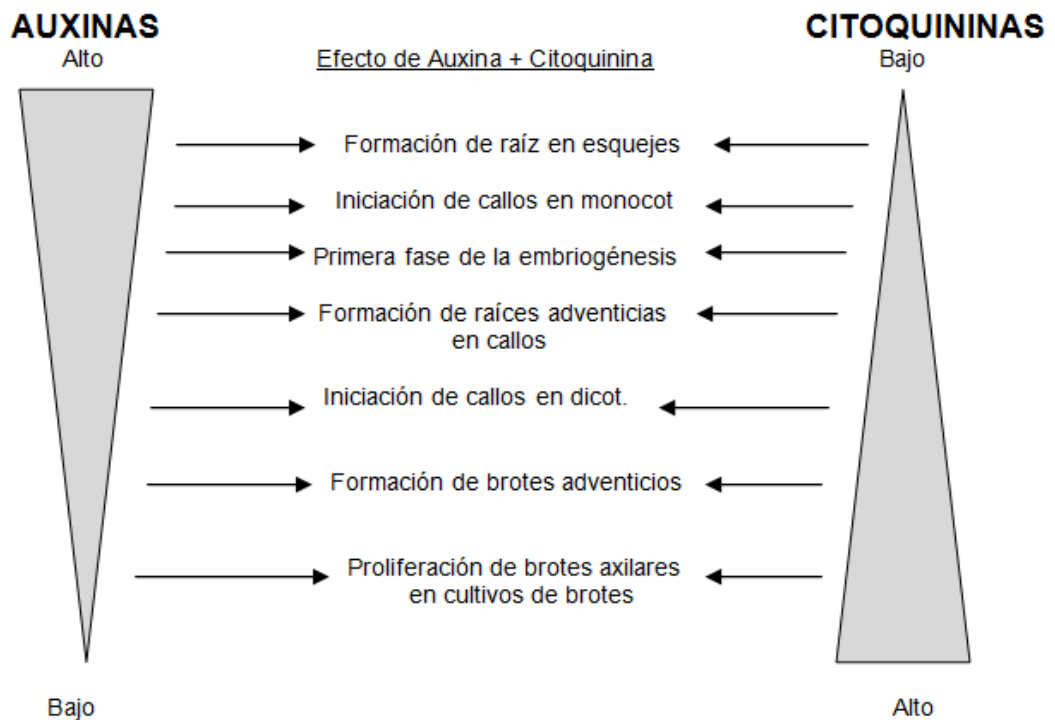


Figura 2. Las concentraciones relativas de auxina y citoquinina que suelen ser necesarios para el crecimiento y la morfogénesis (George, 1993).

Pierik (1987), George (1993) afirmaron que el uso de reguladores del crecimiento especialmente citoquininas y auxinas es significativo en el cultivo *in vitro* de plantas superiores, y que el cultivo *in vitro* es a menudo imposible sin reguladores. Frecuentemente, se requiere la combinación de dos o más tipos de compuestos, aplicados de forma secuencial o simultánea, y generalmente hay un periodo de latencia antes de que el efecto del tratamiento se haga evidente. Ya sea una auxina y/o una citoquinina tiene que ser añadida al medio para conseguir la extensión de células y/o la división celular, y es totalmente dependiente del tipo de explanto y la especie vegetal utilizado. Por lo tanto, según George (1993), el crecimiento y la morfogénesis *in vitro* son regulados por la interacción y el equilibrio entre los reguladores de crecimiento ofrecidos en el medio, el crecimiento y las sustancias producidas endógenamente. Por ejemplo, los explantos que a su vez producen suficiente auxina no necesitan auxina adicional para la extensión de células y/o división. También hay

explantos que producen suficientes citoquininas y no necesitan citoquininas adicionales que se añadirán al medio (Pierik, 1987).

Las auxinas tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular. Sin embargo, se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos. Existen varias auxinas llamadas "naturales" (indolacético AIA, entre otros); y también se utilizan las auxinas "sintéticas", entre las cuales el ácido 2.4 diclorofenoxiacético (2.4-D), el ácido naftalen acético (ANA) y el ácido indol butírico (AIB) (Rocca, 1991).

Las citoquininas a menudo se utilizan para estimular el crecimiento y el desarrollo; siendo las de uso común la kinetina, 6 γ , γ - dimetilalilamino purina (2iP) y 6-bencil amino purina (BAP). Por lo general promueven la división celular, sobre todo si se añade junto con la auxina. En concentraciones más altas (1-10 mg l⁻¹) pueden inducir la formación de brotes adventicios, pero en general es inhibida la formación de raíces. Promueven la formación de brotes axilares, disminuyendo la dominancia apical y retardan el envejecimiento (Pierik, 1987).

En cebolla se ha probado la combinación de auxinas y citoquininas en el medio de cultivo, para evaluar el efecto que tienen los reguladores de crecimiento con respecto a la multiplicación *in vitro* de los explantos, entre otros. Capote (1996) cultivaron los explantos de cebolla en medio MS con sales minerales diluidas al 50% y para evaluar el efecto de citoquininas el medio MS fue suplementado con diferentes concentraciones de BAP (1, 2, 4, 6 y 8 mg.l⁻¹); 6-furfuril amino purina (CIN) (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 mg.l⁻¹); o de 2iP (1, 2, 4, 6, 8 y 10 mg.l⁻¹); adicionándose en todos los casos 0,05 mg.l⁻¹ de ANA. El efecto de las auxinas fue estudiado mediante la suplementación al medio de diferentes concentraciones de ANA (0.05, 0.5, 1 y 2 mg.l⁻¹), ácido 3-indol acético (AIA) (0.05, 0.5, 1 y 2 mg.l⁻¹), o de ácido indol butírico (AIB) (0.05, 0.5, 1 y 2 mg.l⁻¹), agregando en todos los casos 4 mg.l⁻¹ de BAP. Al analizar el efecto de la adición de diferentes citoquininas, se observó, que la mayor respuesta se obtuvo en los medios suplementados con 4 mg.l⁻¹ de BAP, mientras que la adición de concentraciones altas (8 mg.l⁻¹) resultó inhibitoria para el desarrollo de los brotes. Al analizar el efecto de las diferentes concentraciones de auxinas las mejores respuestas se obtuvieron con la utilización del ANA y los mejores resultados fueron obtenidos con la adición al medio de 0.5 mg.l⁻¹ de ANA.

Rodríguez et al. (1996) evaluaron la propagación *in vitro* de cebolla (*Allium cepa* L.) a partir de tejidos de bulbos. Unas de las pruebas en su trabajo fue la inoculación de discos basales y de yemas caulinares del cultivar “Pira Ouro”, y de yemas caulinares del cultivar “Baia Piriforme”; en medio MS básico suplementado con BAP (0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mg.l⁻¹ para los discos basales; y 1.0 y 2.0 mg.l⁻¹ para las yemas caulinares respectivamente) y ANA (0.0, 0.5 y 1.0 mg.l⁻¹) para los discos basales y AIB (0.0, 0.5, y 1.0 mg.l⁻¹) para las yemas caulinares. Los segmentos de discos basales presentaron brotaciones en todas las combinaciones de BAP y ANA. El mayor porcentaje de regeneración (60 %) fue verificada en medio conteniendo BAP y ANA en concentraciones de 2 y 1.0 mg.l⁻¹ respectivamente, y el mayor número de brotes por explanto (5.15) fue para BAP y ANA en las concentraciones de 4.0 y 1.0 mg.l⁻¹ respectivamente, mostrando una tasa de multiplicación de 20.6 brotes por bulbo. Cuando utilizaron como explantos las yemas caulinares, la mayor tasa de multiplicación observada, para el cultivar “Pira Ouro” fue de 6.5 en los medios suplementados con BAP y AIB en las concentraciones de 2.0 y 0.5 mg.l⁻¹ respectivamente; y para el cultivar “Baia Piriforme” fue de 2.6 con BAP y AIB en concentraciones de 1.0 y 1.0 mg.l⁻¹ respectivamente.

Capote et al. (2000) realizaron un estudio de la variabilidad inducida en células y plántulas de cebolla (*Allium cepa* L.) cultivar “Caribe 71” regeneradas *in vitro*. En el trabajo se estudió el efecto de diferentes reguladores del crecimiento sobre la inducción y crecimiento de callos a partir de segmentos de hojas inmaduras, y la regeneración de plantas a partir de éstos, entre otros estudios (ver cuadro 3). El crecimiento óptimo de los callos de cebolla se obtuvo en los medios MS básicos suplidos con Picloram (0.1 mg.l⁻¹) y 2iP (1 mg.l⁻¹), y la regeneración de plantas fue posible en medios suplementados con 2.4-D (0.01 mg.l⁻¹) y KIN (5 mg.l⁻¹), el número de brotes regenerados fue de 10 a 15 brotes por callo.

Quintana y Robledo (2005) estudiaron la regeneración *in vitro* de plantas de cebolla (*Allium cepa* L.). Utilizaron semillas de las variedades “Cristal White Wax” y “El Toro”, la composición de los medios utilizados se presenta en el cuadro 4. El porcentaje de explantos que formaron plantas y el número promedio de plantas producidas por explanto, tuvieron diferencias altamente significativas entre variedades. Sin embargo, no hubo significancia para medios de cultivo ni para la interacción entre variedades y medios de cultivo. La presencia de las sales del medio N6, así como de los reguladores, en los medios de cultivo empleados, fue suficiente para inducir callos embriogénicos.

Cuadro 3. Composición de los medios de cultivo empleados para la obtención de callos y para la regeneración de plantas de cebolla a partir de éstos.

Auxinas	Citoquininas
Obtención de callos	
2.4-D (1 y 2 mg.l ⁻¹)	BAP (0, 0.1 y 1 mg.l ⁻¹)
AIB (1 y 2 mg.l ⁻¹)	KIN (0, 0.1 y 1 mg.l ⁻¹)
ANA (1 y 2 mg.l ⁻¹)	2iP (0, 0.1 y 1 mg.l ⁻¹)
Picloram (0.1 y 0.5 mg.l ⁻¹)	Zeatina (0, 0.1 y 1 mg.l ⁻¹)
Regeneración de plantas	
2.4-D (0.01mg.l ⁻¹)	KIN (2 y 5 mg.l ⁻¹) y BAP (2 y 5 mg.l ⁻¹)
ANA (0.05 mg.l ⁻¹)	KIN (2 y 5 mg.l ⁻¹) y BAP (2 y 5 mg.l ⁻¹)
AIA (0.05 mg.l ⁻¹)	KIN (2 y 5 mg.l ⁻¹) y BAP (2 y 5 mg.l ⁻¹)
Picloram (0.1mg.l ⁻¹)	2iP (2 y 5 mg.l ⁻¹) y BAP (2 y 5 mg.l ⁻¹)

2.4-D, ácido 2.4 diclorofenoxiacético; AIB, ácido indolbutírico; ANA, ácido naftalenacético; KIN, 6-furfurilaminopurina; BAP, 6-bencilaminopurina; 2iP, 6 γ,γ - dimetilalilamino purina; picloram, ácido 4-amino 3,5,6 – tripicolínico.

Fuente: Capote et al. (2000).

Cuadro 4. Composición de los medios de cultivo utilizados para la regeneración de plantas.

Medio	Sales inorgánicas	Vitaminas	Sacarosa (%)	Reguladores del crecimiento (mg.l ⁻¹)
A	50% MS	50% MS	1.5	
B	N6	MS	2.0	2.4-D, 1.0
C	N6	MS	2.0	2.4-D, 0.5
D	N6	MS	2.0	2.4-D, 0.5 Cinetina, 0.5
E	N6	MS	2.0	2.4-D, 1.0 cinetina, 1.0
F	MS	MS	3.0	
G	MS	MS	3.0	BA, 1.0
H	MS	MS	3.0	BA, 0.5

MS, Murashige y Skoog (1962); 2.4-D, ácido 2.4-Diclorofenoxiacético; cinetina, 6-furfurilaminopurina; BA, N⁶-benciladenina. Fuente: Quintana y Robledo (2005).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

Para desarrollar este trabajo se utilizaron diferentes cultivares de cebolla (*Allium cepa* L.). Para los experimentos de desinfección se utilizaron bulbos obtenidos del campo de la Facultad de Agronomía cultivar “Canarita CRS”, de 26 meses de edad considerando desde la siembra (de semillas) a campo en el primer año del ciclo del cultivo. Se eligió este material porque se contaba con plantas de la misma edad evaluadas por su androesterilidad. Se cosecharon las plantas, y se extrajeron los discos basales de los bulbos.

También se utilizaron los cultivares “Summit” (Bejo Zaden, Holanda), y “Takstar” (Takii Seeds Europe, Holanda), que fueron sembradas en macetas en el invernáculo experimental de la Facultad de Agronomía. Se utilizó una turba spaghnum como sustrato, y se realizaron aplicaciones de fungicidas al sustrato con el riego (Captan a una dosis de 5 gr.litro⁻¹, más Benomil a razón de 1 gr.litro⁻¹) durante el crecimiento de las plantas.

Para los experimentos de tratamientos de hormonas se utilizó la población local “Siete Cáscaras” que fue sembrada en cultivo *in vitro* a partir de semilla.

3.2. TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES

3.2.1. Experimento 1. Efecto de diferentes tiempos de desinfección

Se utilizaron tres cultivares de cebolla para estudiar el efecto de diferentes tiempos de desinfección: “Canarita CRS”, “Summit” y “Takstar”. Los bulbos del cultivar “Canarita CRS” fueron cultivados en el campo experimental de la Facultad de Agronomía por 26 meses. Se sembró a campo y se obtuvieron (en el primer año) los bulbos que fueron replantados para la obtención de semilla. Los cultivares “Summit” y “Takstar”, fueron sembrados y cultivados en el invernáculo experimental de la Facultad de Agronomía, y se introdujeron *in vitro* a los tres meses (figura 3).

En este trabajo, se utilizaron las yemas ubicadas en el disco basal del bulbo de la cebolla. A los bulbos de cebolla, se le sacaron las hojas más externas y se extrajeron los discos basales de un tamaño de 2 a 2.5 cm de altura para el cultivar “Canarita CRS”, y 1.5 a 2 cm de altura de base para los cultivares “Summit” y “Takstar”. En forma inmediata, se realizó la desinfección

de dichos discos, comenzando con el lavado con detergente comercial y agua corriente por 15 minutos. Posteriormente y en condiciones asépticas, los explantos fueron sumergidos en etanol 70% durante 20 minutos. Luego se procedió a un doble enjuague con agua destilada estéril. Finalmente se sumergió en una solución de hipoclorito de sodio comercial (10%) durante distintos tiempos según tratamiento: 30, 60 y 90 minutos de inmersión (tratamientos 30, 60 y 90, respectivamente). Posteriormente, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Una vez concluida la desinfección se procedió a la introducción *in vitro* de los explantos. En el momento de la siembra, se utilizaron diferentes explantos según la variedad: los discos fueron divididos longitudinalmente en seis y cuatro secciones para el cultivar "Canarita CRS". En el caso de los cultivares "Summit" y "Takstar" se utilizó como explanto el disco entero; y en algunos casos la mitad del disco, ya que se dividió longitudinalmente el disco en dos secciones (figura 4).

Para todos los cultivares, los explantos fueron cultivados en medio MS (Murashige y Skoog, 1962, ver cuadro 5) con las sales minerales diluidas al 50 %, 30 g.l⁻¹ de sacarosa y 7 g.l⁻¹ de agar. El pH fue ajustado a 5.8. Los medios fueron esterilizados en un autoclave a 121 °C y 1.5 Kg.cm⁻² durante 20 minutos.



Figura 3. Plantas de los cultivares “Summit” y “Takstar” creciendo en macetas en el invernáculo de la Facultad de Agronomía.

Cuadro 5. Composición de minerales y vitaminas para la preparación del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962).

Elementos Minerales	mg/l
Macro-elementos	
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
Micro-elementos	
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	10,6
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
Hierro:	
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,3
Vitaminas	
Tiamina	10
Acido Nicotínico	1
Piridoxina	1
Myoinositol	100

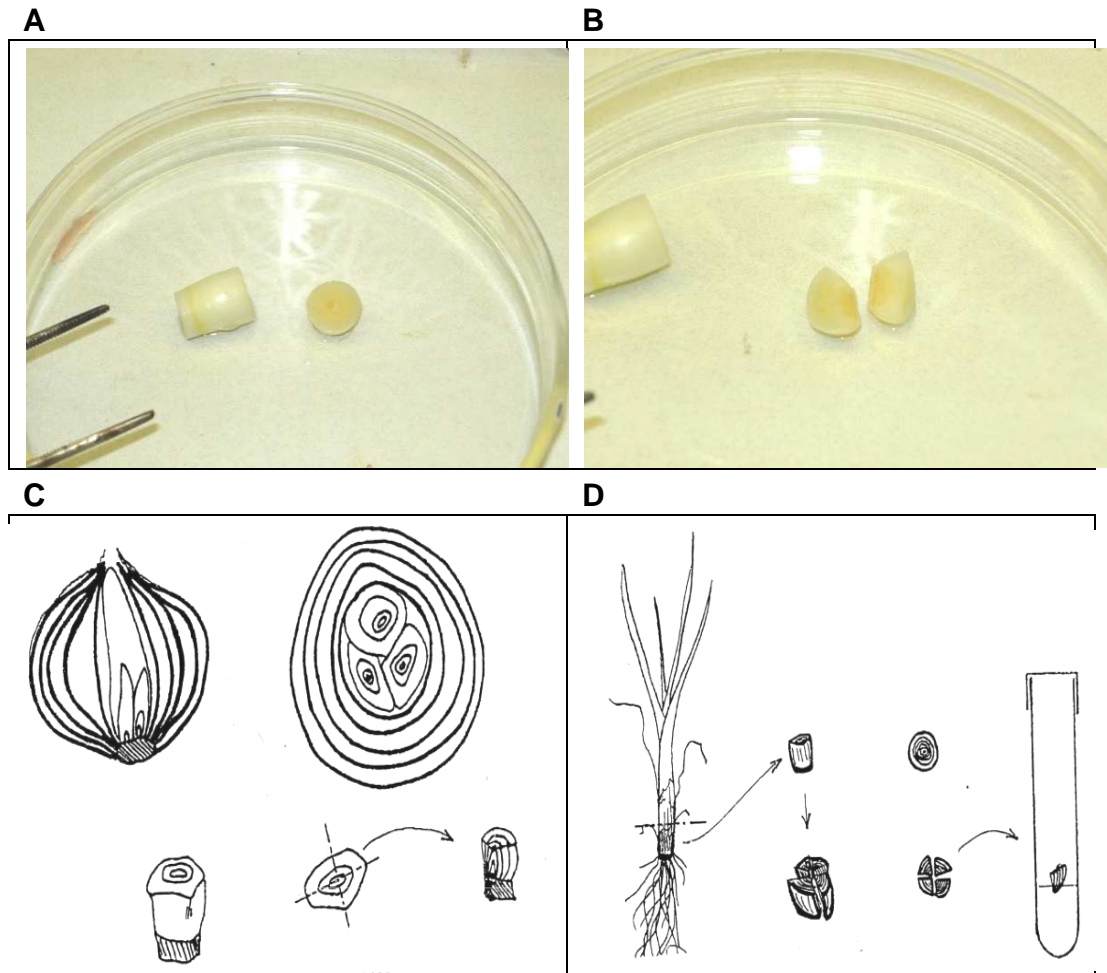


Figura 4. Modo de preparación de explantos. (A) Disco basal a partir de una planta cultivada en invernáculo. (B) Corte en dos secciones del disco basal. (C) Modo de preparación de explantos para introducir *in vitro* a partir de bulbos crecidos en canteros a campo. (D) Modo de preparación de explantos a partir de plantas *in vitro* y de plantas jóvenes crecidas en invernáculo, divididos en cuatro secciones.

Cada explanto fue colocado individualmente en un tubo de ensayo conteniendo 25 ml de medio de cultivo, y colocados en una cámara de crecimiento de ambiente controlado, a una temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, con fotoperiodo de 16 horas de luz (lámparas de luz blanca fría fluorescente, con intensidad lumínica de $25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

3.2.2. Experimento 2. Efecto de la combinación de diferentes reguladores de crecimiento

Para evaluar los diferentes reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones en el medio de cultivo MS, se utilizaron los discos basales de los bulbos de la población local "Siete Cáscara", que fueron sembrados en cultivo *in vitro* por 3 meses. Se utilizaron como explantos las yemas ubicadas en el disco basal del bulbo de la cebolla.

En condiciones asépticas, se eliminó la parte superior de las hojas y las raíces del bulbo, luego se extrajo el disco basal de un tamaño de 1.5 a 2 cm. de altura. Al momento de la siembra, se utilizaron como explanto los discos basales enteros y fueron cultivados en el medio MS (Murashige y Skoog, 1962), con las sales minerales diluidas al 50 %, 30 g.l⁻¹ de sacarosa, 7 g.l⁻¹ de agar, 0.5 mg.l⁻¹ de ANA (ácido naftalen-acético) y se suplementó el medio con diferentes reguladores de crecimiento, variando las concentraciones de la citoquinina en el mismo. Los tratamientos probados fueron: 0 mg.l⁻¹ citoquinina (control), 2 y 4 mg.l⁻¹ de 6-bencil amino purina (BAP), o 2 y 4 mg.l⁻¹ de 6Y,Y - dimetilalilamino purina (2iP). En todos los casos el pH del medio fue ajustado a 5.8 y esterilizados en un autoclave a 121 °C y 1.5 Kg. cm⁻² durante 20 min.

Todos los ensayos fueron realizados en tubos de ensayos con 25 ml de medio y colocados en una cámara de crecimiento de ambiente controlado, a una temperatura de 24±2 °C, con fotoperiodo de 16 horas de luz (lámparas de luz blanca fría fluorescente, con intensidad lumínica de 25 μmol m⁻²s⁻¹) y 8 horas de oscuridad. En cada tubo se instaló un explanto.

3.3. EVALUACIONES REALIZADAS

3.3.1. Evaluación del efecto de diferentes tiempos de desinfección

Para el estudio del efecto de diferentes tiempos de desinfección; 30, 60 y 90 minutos en hipoclorito de sodio al 10%, se probaron diferentes tipos de explanto (divisiones longitudinales del disco basal y entero) y se utilizaron los cultivares “Canarita”, “Summit” y “Takstar”.

Para el cultivar “Canarita”, los ensayos fueron realizados el 23 de junio y el 5 de agosto del 2008. Cada ensayo constó con 12 repeticiones por tratamiento dando un total de 36 explantos estudiados por fecha. Por otra parte los cultivares “Summit” y “Takstar” se ensayaron en 5 fechas diferentes, con 10 repeticiones por tratamiento, utilizando 180 explantos en total (ver cuadro 6).

Cuadro 6. Fecha, números y tipos de explantos de los ensayos realizados para el estudio del efecto de diferentes tiempos de desinfección, según cultivar.

Experi- mento	Material Vegetal			No. Total de explantos	No. total de repeticiones / trat.			Fecha de la última observación
	Cultivar	Tipo de explanto	Fecha de realización del ensayo		Tiempo de desinfección (min.)			
					30	60	90	
1	Canarita	Divididos/6	23/06/08	36	12	12	12	21/07/08
3		Divididos/4	05/08/08	36	12	12	12	03/09/08
4	Summit	Enteros	20/10/08	30	10	10	10	24/11/08
9		Enteros	13/11/08	30	10	10	10	20/12/08
7		Divididos/2	12/11/08	30	10	10	10	20/12/08
5	Takstar	Enteros	25/10/08	30	10	10	10	04/12/08
8		Enteros	13/11/08	30	10	10	10	20/12/08
6		Divididos/2	27/10/08	30	10	10	10	08/12/08

Las observaciones y evaluaciones de los ensayos, se realizaron semanalmente. Las evaluaciones consistieron en determinar si las plantas estaban sanas o si las plantas estaban contaminadas. Las plantas también se caracterizaron como plantas verde y que regeneraron, o como plantas muertas.

3.3.2. Evaluación del efecto de los reguladores de crecimiento

Para el estudio del efecto de la combinación de diferentes reguladores de crecimiento (BAP, 2iP y ANA) suplementados al medio de cultivo MS, se utilizó la población local “Siete Cascaras”. Esta fue sembrado *in vitro* en condiciones asépticas.

Se evaluaron cinco tratamientos que consistieron en combinaciones auxina-citoquinina (ver Cuadro 7). Los tratamientos contaron con 0.5 mg/l de ácido naftalen-acético (ANA) en todos los casos, del grupo de las auxinas, en combinación con diferentes concentraciones de dos citoquininas: 0, 2 y 4 mg/l de 6-bencil amino purina (BAP), o con 2 y 4 mg/l de 6γ,γ-dimetilalilamino purina (2iP). BAP pertenece a la primera generación de citoquininas sintéticas, mientras que 2iP es una citoquinina natural.

Cuadro 7. Fechas, números y tipos de explantos utilizados para evaluar los efectos de los reguladores de crecimiento en la población local “Siete Cascaras”.

Experi- mento	Fecha de realización del ensayo	No Total de explantos	No total de repeticiones / trat.				Fecha de la última observación	
			control	2 mg.l ⁻¹ 2iP	4 mg.l ⁻¹ 2iP	2 mg.l ⁻¹ BAP		4 mg.l ⁻¹ BAP
A	23/10/09	50	10	10	10	10	10	20/11/09
B	29/10/09	50	10	10	10	10	10	01/12/09
C	06/11/09	50	10	10	10	10	10	11/12/09

Los ensayos fueron realizados en tres fechas diferentes, con diez repeticiones por tratamiento (ver cuadro 7). Las evaluaciones fueron semanales, donde se midió la longitud (en centímetros) de hojas y raíces

producidas por planta. Se realizó un promedio por tratamiento de las diez repeticiones estudiadas.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Las variables proporción de plantas sanas y plantas contaminadas se analizaron como variables complementarias. Para las variables proporción de plantas sanas, de plantas contaminadas, plantas regeneradas, y plantas muertas, se ajustaron modelos lineales generalizados asumiendo distribución binomial. Se utilizó el paquete Genstat Discovery Edition 4.24 (Rothamsted, Reino Unido).

Las variables largo de hoja (cm) y largo de raíz (cm) se midieron en los experimentos destinados a evaluar el efecto de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo. Estas variables se transformaron por la raíz cuadrada, y se realizó el análisis de varianza, y contrastes según el test de la mínima diferencia significativa (LSD) protegido de Fisher (Steel y Torrie, 1985). Se analizaron los efectos de los cinco tratamientos de reguladores de crecimiento individualmente. Además, se analizaron comparaciones múltiples mediante contrastes, definidos como combinaciones lineales de parámetros asociados a los tratamientos (Montgomery, 2002). Estas combinaciones se describen en el cuadro 8.

Cuadro 8. Contrastes entre tratamientos de hormonas.

Contrastes		Control	2IP 2 mg/l	2IP 4 mg/l	BAP 2 mg/l	BAP 4 mg/l
Control vs. Hormonas	vs.	+ 4	-1	-1	-1	-1
BAP vs. 2IP		0	+1	+1	-1	-1
Control vs. 2IP		-2	+1	+1	0	0
Control vs. BAP		-2	0	0	+1	+1

4. RESULTADOS

4.1. EFECTO DE DIFERENTES TIEMPOS DE DESINFECCIÓN

En los experimentos realizados con el objetivo de analizar el efecto de diferentes tiempos de desinfección mediante inmersión en hipoclorito de sodio, se observaron diferentes respuestas entre experimentos y cultivares en el número de plantas sanas y el número de plantas contaminadas (cuadro 9). Los experimentos con el material proveniente de campo con 26 meses de edad (cultivar “Canarita CRS”) tuvieron alta proporción de infecciones, con 90 a 100% aproximado de plantas contaminadas en todos los tratamientos de desinfección. En estos experimentos no se obtuvieron plantas sanas con ninguno de los tratamientos de desinfección. La excepción fue el experimento 1, en el cual con 60 y 90 minutos de desinfección se obtuvieron 1 y 3 plantas sanas respectivamente.

Con el material vegetal proveniente de invernáculo con tres meses de edad (cultivares “Summit” y “Takstar”) se obtuvieron proporciones más altas de plantas sanas que contaminadas. De cada 10 plantas experimentadas por tratamiento de desinfección, entre 6 a 10 plantas fueron sanas, y consecuentemente, el rango obtenido de plantas contaminadas fue entre 5 y 0 plantas contaminadas. Se comprobó una alta incidencia de contaminantes microbianos en las plantas *in vitro* evaluadas, tanto bacterias como hongos (figura 5).

Se observaron diferencias significativas entre los experimentos con el cultivar “Canarita” y los experimentos con los cultivares “Summit” y “Takstar” en la proporción de plantas sanas y plantas contaminadas en los diferentes tratamientos de desinfección (cuadro 9). La interacción experimento por tratamiento fue significativa ($p < 0.001$).

En la Figura 6 se puede visualizar la diferencia entre el cultivar “Canarita”, que tuvo un alto porcentaje de plantas contaminadas con respecto a los cultivares “Summit” y “Takstar”. Las contaminaciones son causadas por microorganismos principalmente por bacterias y hongos (figura 5). Para los experimentos con los cultivares “Summit” y “Takstar”, los tratamientos de desinfección de 30, 60 y 90 minutos de inmersión en hipoclorito no mostraron diferencias significativas en la proporción de plantas sanas y contaminadas

(cuadro 9). Todos los tratamientos de desinfección dieron un alto porcentaje de plantas sanas, con valores entre 70 y 100% del número de plántulas evaluadas. Tampoco se observaron diferencias significativas entre las diferentes fechas (repeticiones de los experimentos) y tipos de explantos (disco basal entero vs. disco basal dividido en sección longitudinal) (cuadro 9).



Figura 5. Tubos con explantos introducidos a partir de discos basales contaminados por microorganismos, tanto hongos como bacterias.

Cuadro 9. Número de plantas sanas y plantas contaminadas para cada experimento, cultivar, y tipo de explanto, para los tres tiempos de desinfección evaluados.

Exp.	Material Vegetal			Sanas			Contaminadas		
	Cultivar	Tipo de explanto	No Total	Tiempo de desinfección (min.)			30	60	90
			30	60	90	30	60	90	
1	Canarita	Divididos	12	0 g	1 fg	3 ef	12 a	11 a	9 ab
3		Divididos	12	0 g	0 g	0 g	12 a	12 a	12 a
4	Summit	Enteros	10	7 bcd	9 ab	10 a	3 cde	1 ef	0 f
9		Enteros	10	7 bcd	9 ab	9 ab	3 cde	1 ef	1 ef
7		Divididos	10	10 a	9 ab	10 a	0 f	1 ef	0 f
5	Takstar	Enteros	10	9 ab	5 de	6 cd	1 ef	5 bc	4 cd
8		Enteros	10	10 a	10 a	7 bcd	0 f	0 f	3 cde
6		Divididos	10	8 abc	8 abc	9 ab	2 def	2 def	1 ef

Una vez que se obtienen plantas sanas, interesa que desarrollen una brotación normal. Al evaluar la proporción de plantas que regeneraron en cada tratamiento de desinfección, se observó que la mayor proporción de plantas regeneradas fueron registradas en el tratamiento de 30 minutos de inmersión en hipoclorito de sodio en los experimentos con los cultivares “Summit” y “Takstar” (cuadro 10). Con el tratamiento de 30 minutos de inmersión, se obtuvieron de 7 a 10 plantas aproximadamente por cada 10 tubos estudiados. El tratamiento de 90 minutos fue el que rindió los valores más bajos de plantas regeneradas: 1 a 2 plantas regeneradas por cada 10 tubos estudiados. El cultivar “Canarita”, con el que se utilizaron plantas de campo de 23 meses de edad, no tuvo plantas sanas y regeneradas en ninguno de los tratamientos, con casi un 100 % de plantas muertas oxidadas (cuadro 10).

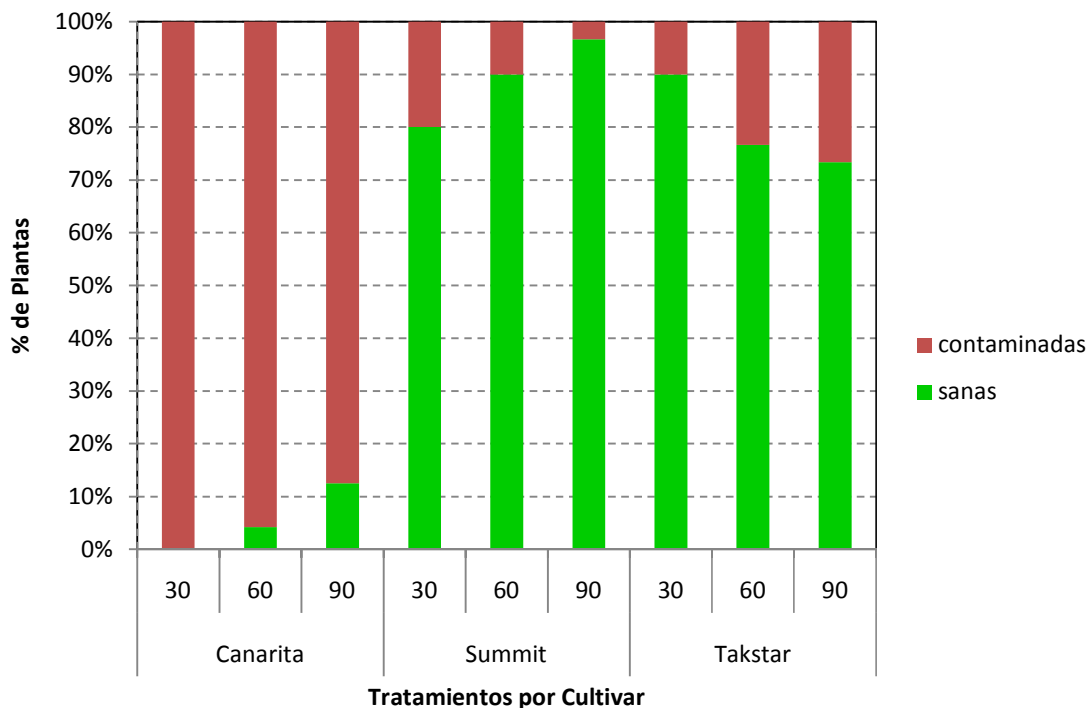


Figura 6. Porcentaje de plantas sanas y contaminadas, según tratamiento de desinfección (inmersión en hipoclorito de sodio durante 30, 60 o 90 minutos) y cultivar.

Para los experimentos con “Summit” y “Takstar”, los explantos que fueron sumergidos por más tiempo (90 minutos) en la solución de hipoclorito de sodio obtuvieron menos plantas regeneradas (figura 5). Para todos los experimentos el tratamiento de 90 minutos no obtuvo plantas regeneradas sin diferencias significativas entre experimentos, salvo el experimento 7 que registro 5 plantas regeneradas. El tratamiento de 30 minutos mostró los valores más altos de plantas regeneradas, seguido por el tratamiento de 60 minutos que obtuvo mayores resultados que el tratamiento de 90 minutos con respecto al número de plantas regeneradas obtenidas. La variedad “Canarita” no obtuvo ninguna planta regenerada en ninguno de los tratamientos ni en ninguna fecha de realizado el ensayo (figura 7).

Cuadro 10. Número de plantas verdes que se regeneraron y de plantas muertas, según experimento, cultivar y tipo de explanto para cada tiempo de desinfección (30, 60 o 90 minutos de inmersión en hipoclorito de sodio).

Exper.	Material Vegetal			regeneradas			muertas		
	Cultivar	Tipo de explanto ¹	No Total	Tiempo de desinfección (min.) ²			30	60	90
1	Canarita	Divididos	12	0 f	0 f	0 f	12 a	12 a	12 a
3		Divididos	12	0 f	0 f	0 f	8 b	8 b	12 a
4	Summit	Enteros	10	7 bc	1 ef	0 f	3 cde	3 cde	8 ab
9		Enteros	10	6 bc	3 de	1 ef	0 e	5 bcd	1 e
7		Divididos	10	10 a	8 ab	5 cd	0 e	2 de	0 e
5	Takstar	Enteros	10	8 ab	6 bc	2 ef	1 e	6 bc	8 ab
8		Enteros	10	10 a	5 cd	0 f	0 e	0 e	6 bc
6		Divididos	10	8 ab	0 f	0 f	2 de	7 ab	3cde

Para cada variable, las medias seguidas de las mismas letras no difieren estadísticamente ($p < 0.05$).

² Disco basal de la cebolla dividido en dos partes, o entero.

Para las plantas que no se regeneraron normalmente, el tejido vegetal presentó un aspecto trasparente dando una apariencia a tejido traslucido y sin llegar a brotar (plantas muertas). Se pudo visualizar en los cultivares “Summit” y “Takstar”, que el tratamiento que tuvo más efecto negativo sobre la brotación fue el de 90 minutos. Con este tratamiento, se obtuvo promediamente el mayor número de plantas muertas, aunque sin tener diferencia significativas (en varios experimentos) con el tratamiento de 60 minutos. En el cultivar “Canarita” se observó que el 90 a 100% de las plantas murieron en todos los tratamientos (cuadro 11, figura 8).

Cuadro 11. Proporción de plantas regeneradas y muertas, según tratamiento (tiempo de desinfección) y tipo de explanto (entero o dividido), utilizando promedios de los cultivares “Summit” y “Takstar”.

Tratamiento	Plantas regeneradas		Plantas muertas	
	Dividido	Entero	Dividido	Entero
30	0.900	0.775	0.100	0.100
60	0.400	0.250	0.450	0.350
90	0.250	0.075	0.150	0.575

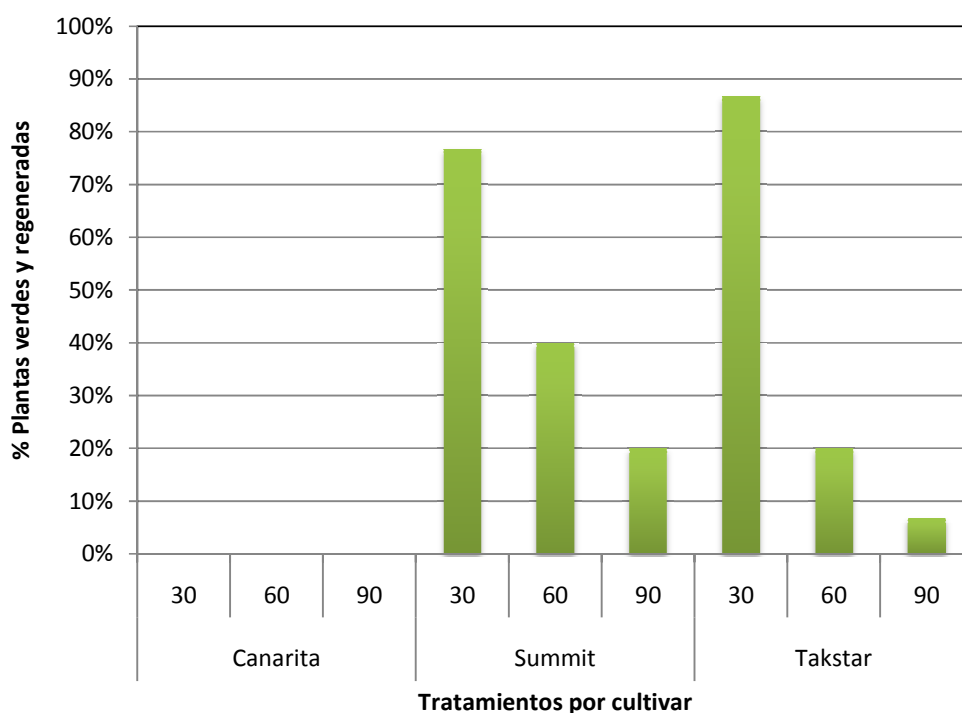


Figura 7. Porcentaje de plantas verdes y regeneradas para cada tratamiento de desinfección (30, 60 y 90 minutos de inmersión en hipoclorito de sodio) y cada cultivar de cebolla.

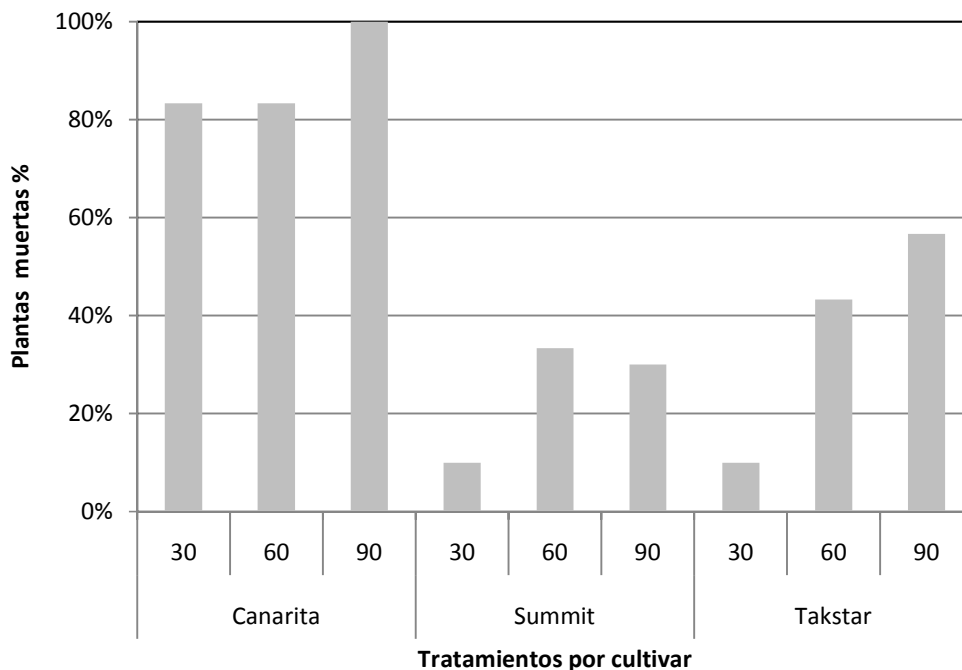
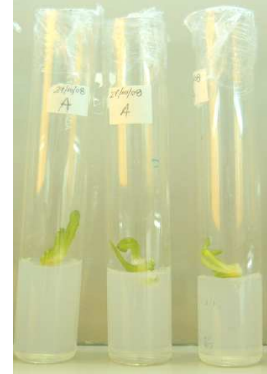


Figura 8. Porcentaje de plantas muertas, según tipo de explanto y cultivar.

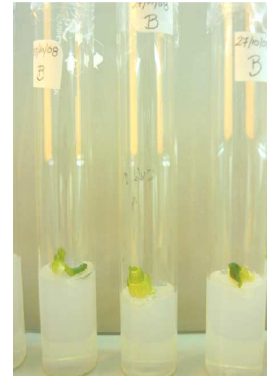
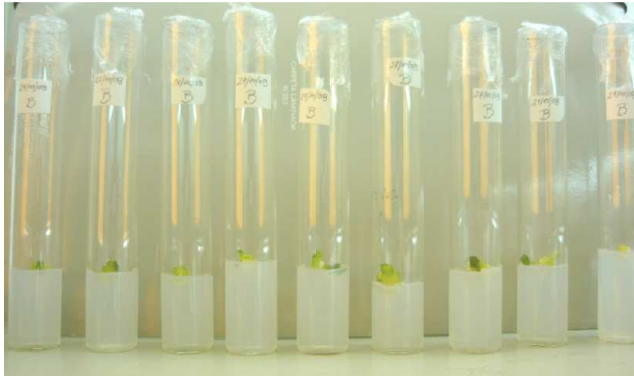
Como consecuencia de lo expuesto, con respecto a la cantidad de plantas muertas, se observó que el tratamiento de 30 minutos (para los cultivares “Summit” y “Takstar”) obtuvo los menores valores con 5 a 10% de plantas muertas (figura 8 y 9). Pero para el cultivar “Canarita”, las proporciones de plantas muertas en todos los tratamientos superaron el 80%, y en el caso del tratamiento de 90 minutos alcanzó el 100% de plantas muertas (figura 8 y 9).

Se estudió estadísticamente el efecto de los cortes de los discos basales para utilizarlos como explanto (enteros o seccionados) con respecto a las plantas regeneradas y las plantas muertas, se compararon los cultivares “Summit” y “Takstar”, y se obtuvieron los resultados que se muestran en el cuadro 10. La mayor probabilidad de obtener plantas sanas y regeneradas se obtuvo utilizando como explanto una sección del disco basal previamente dividido mediante la desinfección de 30 minutos en hipoclorito de sodio. Mediante esa combinación de tratamientos, se alcanzó un 90 % de plantas regeneradas. Los tratamientos que presentaron menor probabilidad de obtener plantas regeneradas fueron el de 90 minutos, con los explantos divididos (25%) y los de 60 y 90 minutos con los explantos enteros (25 y 7.5% respectivamente) (cuadro 11).

A



B



C

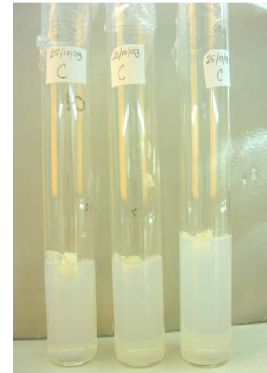
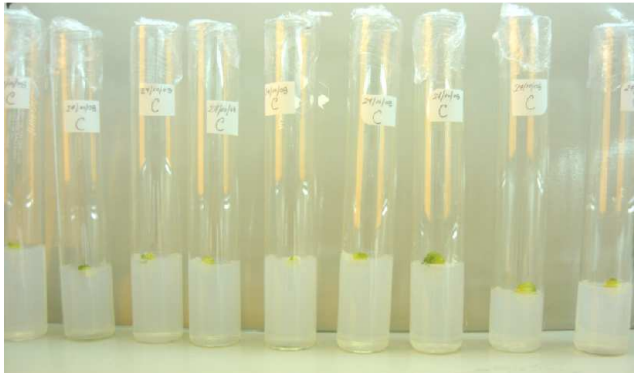


Figura 9. Foto de tratamientos de desinfección visualizando plantas verdes y plantas muertas por oxidación, (A) tratamiento de 30 minutos con plantas verdes, (B) tratamiento de 60 minutos y (C) tratamiento de 90 minutos con plantas muertas oxidadas.

Para los valores promedios de los cultivares “Summit” y “Takstar”, los mayores porcentajes de plantas muertas fueron obtenidas en el tratamiento en los que se combinaron 90 minutos de inmersión en hipoclorito de sodio y disco basal entero (57.5 %), y los tratamientos de 60 minutos con discos basales enteros o divididos. En contraste, en el tratamiento de 30 minutos se obtuvo un 10 % de plantas muertas para ambos tipos de cortes del explanto (entero y dividido) (cuadro 11).

4.2. EVALUACION DEL EFECTO DE DIFERENTES REGULADORES DE CRECIMIENTO

Los cinco medios de cultivo evaluados permitieron un crecimiento aceptable de las plantas *in vitro* desarrollando la parte aérea y la raíz. En el cuadro 12 se muestran los resultados del análisis de varianza. Para estudiar el efecto de los reguladores de crecimiento, se promediaron los valores de longitud de parte aérea o de raíz de las diez repeticiones por cada tratamiento, a la cuarta semana de instalados los explantos en el medio de cultivo, en presencia de los reguladores mencionados en materiales y métodos.

Los dos tratamientos con BAP tuvieron mejor calidad de plántulas, con mayor crecimiento de la parte aérea (9 cm longitud promedio de hoja) que otros tratamientos, aunque con menor crecimiento de raíces (1 cm de raíz en promedio). Contrariamente, los tratamientos con 2iP tuvieron el menor crecimiento de la parte aérea (alrededor de 5 a 6 cm) y la mayor longitud de raíz promedio (2 cm). Al analizar el número de brotes por explanto, se observó que al emplear las yemas enteras se desarrolló un brote solamente, independiente de las concentraciones y tipo de regulador utilizado (cuadro 12 y figura 11).

En la figura 10 se puede visualizar las diferencias significativas entre los tratamientos y la longitud de hoja y raíz. No se registraron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de BAP en la longitud de hoja, pero sí hay diferencias entre los medios de cultivo con BAP, y los tratamientos 2iP 2 mg/l y el control. Con respecto a la longitud de la raíz no hubo diferencias significativas entre los dos tratamientos con 2iP, pero éstos se diferenciaron del control y de los tratamientos con BAP. En tanto, no hubo diferencias entre el control y los tratamientos con BAP con respecto a la longitud de la raíz (cuadro 12, figuras 10 y 11).

Cuadro 12. Longitud de hoja y de raíz, y tasa de multiplicación de las plantas repicadas en medio MS con diferentes reguladores del crecimiento y concentraciones, para cada experimento.

Tratamientos		Hoja (cm)	Raíz (cm)	Tasa de multiplicación
Experimento A				
Control		5.6	0.7	1
2IP	2 mg/l	4.3	2.3	1
	4 mg/l	5.4	2.1	1
BAP	2 mg/l	10.2	0.9	1
	4 mg/l	9.2	1.4	1
Experimento B				
Control		6.9	0.5	1
2IP	2 mg/l	7.2	1.5	1
	4 mg/l	6.2	2.0	1
BAP	2 mg/l	10.5	1.1	1
	4 mg/l	10.2	0.9	1
Experimento C				
Control		7.1	1.6	1
2IP	2 mg/l	5.3	1.8	1
	4 mg/l	4.3	1.5	1
BAP	2 mg/l	6.8	0.9	1
	4 mg/l	8.6	0.5	1

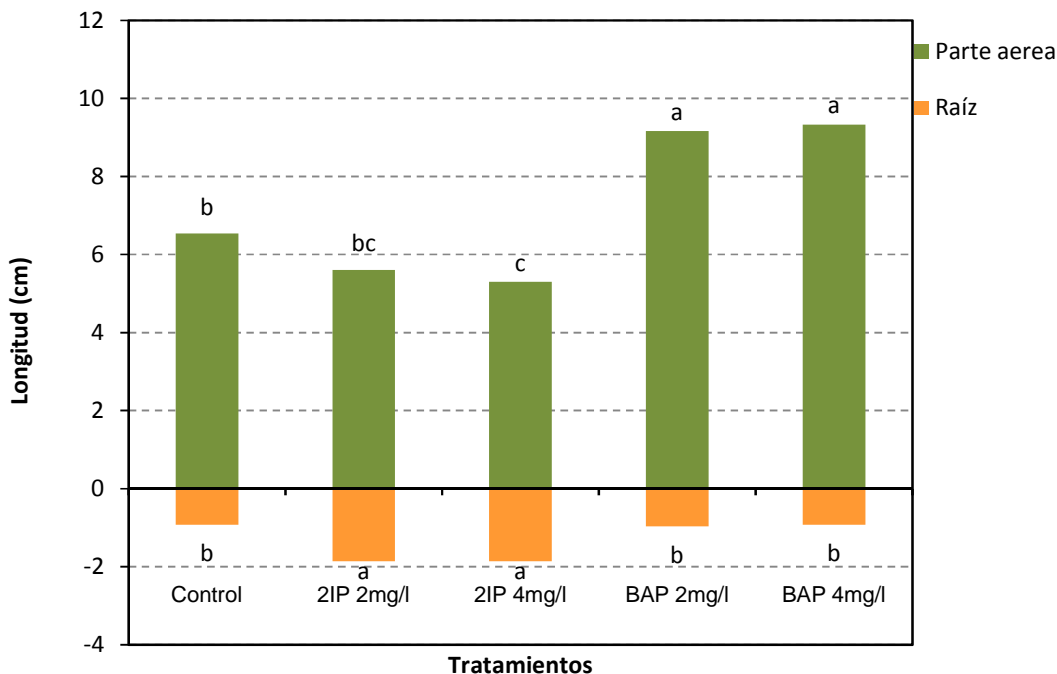


Figura 10. Longitud promedio de hojas y raíces según tratamientos con diferentes reguladores del crecimiento y concentraciones en el medio de cultivo. Los datos son promedio de los experimentos A, B y C.

Se realizaron los contrastes para analizar el efecto entre los tratamientos, que se ilustra en el cuadro 13 y 14. En la primera comparación entre el efecto de las hormonas con respecto al control, demuestra que el efecto del agregado de las mismas es significativo para la longitud de raíz, pero no así para la longitud de hoja. Cuando se realizó el contraste entre las hormonas BAP y 2iP resultó significativo para ambos parámetros de longitud. Entre el control y la hormona 2iP dio significativo para la longitud de raíz; y para el control y el tratamiento con BAP resultó significativo para la longitud de hoja.

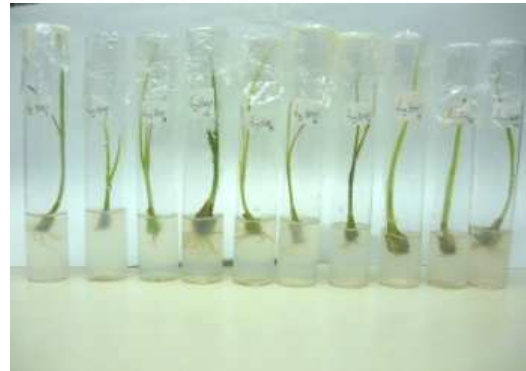
A



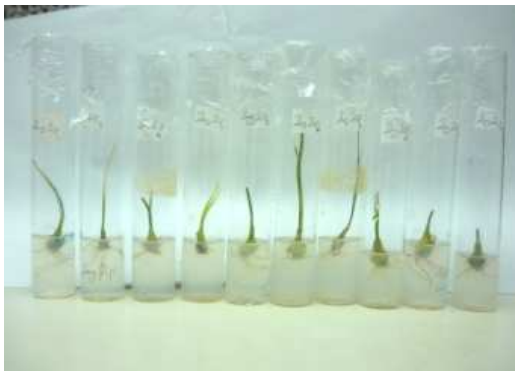
B



C



D



E

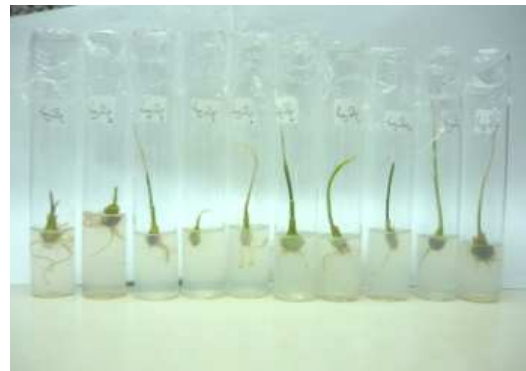


Figura 11. Fotos de los explantos de cebolla en los tratamientos con diferentes tipo de reguladores de crecimiento y concentraciones agregados al medio de cultivo MS: (A) tratamiento control, (B) tratamiento 2 mg.l^{-1} BAP, (C) tratamiento 4 mg.l^{-1} BAP, (D) tratamiento 2 mg.l^{-1} 2iP, (E) tratamiento 4 mg.l^{-1} 2iP.

Cuadro 13. Probabilidad de error asociada a los contrastes entre tratamientos de hormonas.

Contrastes y tratamientos	Hoja (cm)	Raíz (cm)
Contrastes		
Control vs. Hormonas	0.246	0.025 *
BAP vs. 2IP	< 0.001 *	< 0.001 *
Control vs. 2IP	0.069	< 0.001*
Control vs. BAP	< 0.001 *	0.994
Medias de los tratamientos		
Control	6.52	0.93
Hormonas	7.20	1.37
2IP	5.34	1.81
BAP	9.06	0.93

* Hay diferencia significativa entre tratamientos.

Cuadro 14. Análisis de varianza de los tratamientos.

Tratamientos	Hoja	Raíz	Hoja (SR)	Raíz (SR)
Control	6.52	-0.933		
2IP	2 mg/l	5.59	-1.800	
	4 mg/l	5.09	-1.820	
BAP	2 mg/l	8.80	-0.970	
	4 mg/l	9.32	-0.893	
<u>Promedios</u>	<u>7.06</u>	<u>1.283</u>		
L.S.D.	–	–	0.3465	0.2233
C.V.%	40.6	72.3	26.5	40.5

5. DISCUSIÓN

La cebolla (*Allium cepa* L.) es una especie hortícola de gran importancia económica para Uruguay. Se realizan numerosos esfuerzos en el mejoramiento genético con el objetivo de buscar nuevas variedades que se adapten mejor a las condiciones climáticas de este país, y que garanticen rendimientos más elevados.

La ocurrencia natural de macho esterilidad genético-citoplasmática en genotipos de cebolla es utilizada para cruzamientos con diversos fines y la obtención de híbridos. La micropropagación de esos genotipos puede ser altamente ventajosa creando numerosas copias para cruzamientos y para facilitar la búsqueda de líneas mantenedoras macho-fértiles para la utilización en programas de mejoramiento genético.

El objetivo de este trabajo fue ajustar un protocolo para la introducción y multiplicación *in vitro* de cebolla. La propagación *in vitro* permite la regeneración de plantas de un genotipo deseable en condiciones asépticas. Esta técnica se utiliza con la intención de producir plantas libres de enfermedades, lograr la propagación clonal, la conservación de germoplasma, el rescate de híbridos interespecíficos estériles y la transformación genética.

El cultivo de ápices del disco basal es una opción en el establecimiento de protocolos de multiplicación *in vitro* de cebolla. En este trabajo se evaluaron tres tratamientos de desinfección y cinco combinaciones de diferentes reguladores del crecimiento suplementados al medio de cultivo MS, utilizando como explanto el disco basal de los bulbos de cuatro variedades diferentes de cebolla.

5.1. DIFERENTES TIEMPOS DE DESINFECCIÓN

Según Roca (1991), cuando se realiza la desinfección del material previamente a ser introducido, los explantos provenientes de vegetales que crecen en invernaderos o en cuartos climatizados son relativamente más fáciles de desinfectar que los provenientes de plantas que crecen en el campo; y las

aplicaciones de fungicidas o bactericidas, aplicadas previamente a las plantas, pueden ser de utilidad.

Los resultados del cultivar "Canarita", en el presente trabajo, dieron (en casi todos los tratamientos) aproximadamente un 100% de los explantos contaminados, luego de la desinfección y al ser introducidas *in vitro*. Estos resultados fueron los esperados de acuerdo con Roca (1991), y se pueden atribuir a que el material utilizado tenía 26 meses de edad y que era provenientes de campo. Este tipo de material podría poseer más microorganismos contaminantes localizados en las numerosos catáfilas presentes en los bulbos y eso dificulta el proceso de desinfección. La ocurrencia de infecciones endógenas en este tipo de material vegetal sería una de las causas de la elevada contaminación observada. Esto conlleva a que plantas provenientes de suelo presentan una carga mayor de microorganismos que plantas provenientes del invernáculo.

Por el contrario, los otros materiales utilizados (Summit y Takstar) que tenían tres meses desde la siembra y provenían de cultivo en invernáculo, tuvieron una frecuencia de contaminaciones mucho más baja. Además, se realizaron tratamientos con fungicidas, y eso llevó a contribuir a la baja incidencia de contaminaciones en los materiales provenientes del invernáculo.

Cuanto más tiempo de edad fisiológica y de crecimiento, más posibilidades de infectarse posee el material a introducir. De acuerdo con lo reportado por De Melo (2003b) cuando las plantas fueron cultivadas en suelo, los discos basales son la parte de la planta que se ve más afectada en lo que respecta al grado de contaminación, lo que aumenta el riesgo de perder genotipos durante el cultivo *in vitro*. Estas observaciones coinciden con los resultados de este trabajo, y con Roca (1991).

Según De Melo (2003b), los discos basales tienen más alto índice de contaminación cuando las plantas no están en un período de crecimiento intenso, y lograron un 90% de explantos sanos a partir de discos basales provenientes de plantas en un periodo de intenso crecimiento. Rodríguez et al. (1996) reportaron entre el 12 al 80% de explantos de disco basal con contaminación dependiendo del método de desinfección. Estos autores

probaron diferentes pH del hipoclorito de sodio, y diferentes tiempos de inmersión del material vegetal en la solución.

En esta tesis, para los cultivares “Summit” y “Takstar”, el mejor tratamiento de desinfección fue el de 30 minutos de inmersión en hipoclorito de sodio. Mediante este tratamiento se obtuvo un mayor número de plantas *in vitro* regeneradas y sin contaminaciones. Los tratamientos de 60 y 90 minutos dieron como resultado más plantas sanas pero la mayoría muertas, probablemente por el efecto del tiempo de inmersión en el hipoclorito de sodio, que perjudicó al tejido vegetal por oxidación. Rodríguez et al. (1996) describió que períodos más prolongados de inmersión en hipoclorito de sodio por 2 y 2:30 horas perjudicaron a los explantos, causando clorosis y oxidación de los tejidos. Estos resultados discordaron con lo escrito por Novak en 1985, citado por Rodríguez et al. (1996), afirmando que el uso de altas concentraciones del desinfectante por largos períodos de inmersión no perjudica la viabilidad del explanto. En el trabajo de Rodríguez et al. (1996), el mejor resultado fue por 1:30 horas de inmersión en hipoclorito de sodio a pH 6. Acidificar el hipoclorito de sodio fue eficiente en reducir la contaminación.

En nuestras condiciones, el tratamiento de desinfección de 30 minutos fue el que presentó mejores resultados. Se puede inferir que con esta metodología es posible controlar de forma eficaz a los microorganismos provenientes del internódulo en bulbos jóvenes, ya que se obtuvieron elevados porcentajes de plantas sanas que mantienen la capacidad de brotar aún en presencia de hipoclorito de sodio con menos daños de oxidación de los tejidos. Cuanto mayor fue la duración del período de inmersión (60 y 90 minutos) en hipoclorito de sodio en la etapa de desinfección, las contaminaciones se redujeron pero las proporciones de plantas con daños de tejido por oxidación fueron muy importantes.

5.2. EFECTO DE LOS REGULADORES DE CRECIMIENTO

El uso de reguladores del crecimiento, especialmente citoquininas y auxinas es significativamente frecuente en el cultivo *in vitro* de plantas superiores, y el éxito del cultivo *in vitro* en muchas especies es a menudo imposible sin reguladores de crecimiento (George, 1993). Frecuentemente se

requiere la combinación de dos o más tipos de compuestos, aplicados de forma secuencial o simultánea, y generalmente hay un periodo de latencia antes de que los efectos del tratamiento se hagan evidentes (George, 1993). En el presente trabajo, se evaluó el efecto de cinco combinaciones de reguladores del crecimiento suplementados al medio de cultivo MS, a fin de determinar la mejor combinación de reguladores de crecimiento para el crecimiento de las plántulas y para el aumento de la tasa de multiplicación; para su posterior utilización en programas de micropropagación en forma regular.

Se observó que todas las combinaciones de reguladores del crecimiento utilizadas permitieron el buen desarrollo de las plántulas. No obstante se observaron diferencias entre los tratamientos en lo que respecta a la calidad de la plántula lograda, evidenciada a través de la longitud de hoja y de raíz. Los mejores resultados de longitud de hoja se registraron con la suplementación de BAP al medio de cultivo MS indistintamente de su concentración (un promedio de 9.06 cm). Los mejores resultados con respecto a la longitud de raíz se observaron con la suplementación de 2iP al medio de cultivo MS indistintamente de su concentración (un promedio de 1.81 cm).

Se demostró que el efecto del agregado de citoquininas al medio con respecto al control, fue significativo para la longitud de raíz; pero no así para la longitud de hoja, ni número de brotes por explanto. Al analizar el número de brotes por explanto, se observó que independientemente de los tratamientos realizados se obtuvieron tasas de multiplicación de uno. Estos resultados concuerdan con Capote (1996), que observaron que al emplear los discos basales enteros como explanto se produjo un brote por explanto, independientemente de las concentraciones y tipo de regulador utilizado. Sin embargo, cuando utilizaron los discos basales divididos longitudinalmente, observaron que la inducción de brotes varió en relación al tipo de reguladores vegetales adicionados al medio de cultivo. Estos autores consideran que esta respuesta puede ser debida a que los discos basales fueron divididos longitudinalmente en dos porciones, ya que es posible que se haya eliminado la dominancia que ejerce el meristema apical sobre las demás yemas.

No obstante, Rodríguez et al. (1996) utilizaron como explanto los discos basales divididos longitudinalmente (cada disco basal o bulbo obtuvo 4 explantos). Obtuvieron una tasa de multiplicación de 5.15 brotes por explanto

utilizando 4.0 mg l^{-1} de BAP y 1.0 mg l^{-1} de ANA. Capote et al. (2000) observaron que la diferenciación de brotes por callo utilizados, ocurrió en los medios suplementados con KIN y BAP como citoquininas, aunque la adición de 2iP no fue efectiva debido a que no estimuló la formación de brotes y de zonas nodulares verdes. El crecimiento óptimo de los callos de cebolla los obtuvieron en los medios MS básicos suplidos con picloram (0.1 mg.l^{-1}) y 2iP (1 mg.l^{-1}), y la regeneración de plantas fue posible en medios suplementados con 2.4-D (0.01 mg.l^{-1}) y KIN (5 mg.l^{-1}). El número de brotes regenerados fue de 10 a 15 brotes por callo.

Quintana y Robledo (2005) observó diferencias significativas entre variedades con respecto al porcentaje de explantos que formaron plantas y el número promedio de brotes producidas por explanto. El cultivar "Cristal" casi duplicó el porcentaje de explantos que regeneraron plantas en comparación con otros cultivares, y produjo casi cuatro veces más brotes por explanto que el cultivar "El Toro". Se obtuvieron un promedio de 8.3 brotes por explanto para la variedad "Cristal" y 1.9 brotes por explanto para "El Toro". Esto indica que existen factores genéticos involucrados en la respuesta a dichas variables.

En el presente trabajo, el pobre resultado obtenido en la tasa de multiplicación para todos los tratamientos, sugiere la conveniencia de continuar estudiando otras hormonas o concentraciones, en combinación con la división del disco basal.

Las diferencias observadas entre los reguladores con respecto a los resultados de longitud de hoja y raíz, podrían ser debidas al tipo de regulador. 2iP es una hormona natural, y su efecto es más suave comparado con el efecto de BAP, que es una hormona sintéticas. La poca influencia de los reguladores de crecimiento suplementados al medio de cultivo para la inducción de brotes por explanto puede estar relacionada a que los niveles usados de estos reguladores fueron mayores o menores que las concentraciones requeridas para establecer el nivel hormonal endógeno adecuado. Con la aplicación de hormonas se pretende una influencia positiva, para lo cual deben encontrarse en cantidades suficientes en las células adecuadas, para ser reconocidas y capturadas con fuerza por cada uno de los grupos de células que responden a ella (las células blanco). En las células blanco las hormonas son reconocidas por proteínas receptoras. Se esperaría que la proteína receptora pudiese

causar cambios metabólicos que conduzcan a la amplificación de la señal. Incluso en un solo tejido de una especie dada, los cambios durante el desarrollo, se acompañen de un cambio no sólo en la concentración hormonal, sino también en la frecuencia o disponibilidad de las proteínas receptoras y en la capacidad de amplificar la señal hormonal (Salisbury y Ross 1994, Montaldi 1995).

Se pueden observar diferentes respuestas a un mismo tratamiento utilizando diferentes variedades de una misma especie o una misma variedad en diferentes estados de desarrollo (Quintana y Robledo, 2005). Las evaluaciones de los reguladores de crecimiento y sus concentraciones en este trabajo se realizaron con la variedad local "Siete Cáscaras" provenientes de plántulas crecidas desde semillas *in vitro*. Los registros se realizaron a la cuarta semana del inicio de los tratamientos. Varios autores concuerdan en que se observan diferencias en la respuesta de acuerdo al material genético utilizado (Capote 1996, Rodríguez et. al. 1996, Capote et al. 2000, Quintana y Robledo 2005). Por tanto, los resultados obtenidos en el presente trabajo no deberían ser generalizados para el comportamiento con otros materiales genéticos, en particular con los genotipos androestériles para los cuales se pretende realizar la multiplicación *in vitro*.

Por otro lado, estos autores también concuerdan en que existen diferencias en las respuestas entre variedades y sus estados fenológicos. Cuanto mayor es el período de crecimiento (entre 60 y 90 días) del explanto en el medio con reguladores de crecimiento, se observaron mayores diferencias en el número de brotes por explanto y en la calidad de plántula. En este trabajo, efectivamente se comprobó la formación de un alto número de brotes en algunos tubos, en un período mayor a las cuatro semanas definidas formalmente para las evaluaciones. Por tanto, para futuros trabajos, además de la evaluación de otras hormonas, concentraciones, en combinación con otros materiales genéticos, se sugiere la evaluación de los resultados después de un mayor período de crecimiento en los medios de cultivo evaluados.

6. CONCLUSIONES

Para el mantenimiento y la multiplicación de plantas de cebolla androestériles y otros genotipos de interés, el cultivo *in vitro* y la micropropagación serían métodos apropiados. Para ello, este trabajo aportó elementos que contribuyen a ajustar un protocolo para la introducción y multiplicación *in vitro* de genotipos de cebolla, que garantice una rápida multiplicación y que facilite su conservación.

Con la introducción a partir de secciones del disco basal de plantas provenientes de campo se obtuvo un nivel de contaminación muy alto. La introducción a partir de plantas jóvenes producidas en invernáculo fue exitosa, con niveles de contaminación bajos.

Con las plantas sembradas y cultivadas en invernáculo, y con aplicaciones de fungicida al sustrato, el mejor tratamiento de desinfección fue el de 30 minutos de inmersión en hipoclorito de sodio, ya que rindió la mayor cantidad de plantas *in vitro* regeneradas y sin contaminaciones.

Mayores tiempos de exposición al hipoclorito de sodio (60 y 90 minutos) aumentaron la proporción de plantas muertas por oxidación del tejido.

Los tratamientos con el agregado de BAP al medio MS, en las dos concentraciones evaluadas, tuvieron mejor calidad de plántulas, con mayor crecimiento de la parte aérea (longitud promedio de hoja) que los otros tratamientos evaluados, aunque con menor crecimiento de raíces.

Los tratamientos con 2iP en las dos concentraciones evaluadas, tuvieron el menor crecimiento de la parte aérea, y la mayor longitud de raíz promedio.

Empleando los discos basales enteros se obtuvo un brote por explanto, independientemente de las concentraciones y tipo de regulador utilizado.

El cultivo de ápices del disco basal es una opción en el establecimiento de protocolos de multiplicación *in vitro* de cebolla. Se requieren trabajos

adicionales que permitan ajustar la mejor combinación de reguladores de crecimiento para el crecimiento de las plántulas, y para aumentar la tasa de multiplicación.

Es conveniente en los futuros trabajos, utilizar las variedades macho-estériles de interés, utilizar las yemas obtenidas de discos basales divididos longitudinalmente (secciones radiales), y una mayor combinación de reguladores de crecimientos en diferentes estados de desarrollo de la planta y con mayores períodos de crecimiento de los explantos en los medios de cultivo en evaluación.

7. RESUMEN

El cultivo de cebolla (*Allium cepa* L.) es uno de los cultivos hortícolas de mayor importancia en Uruguay por su volumen de producción, superficie cultivada y número de productores involucrados. Desde hace tres décadas se trabaja en el mejoramiento genético de cebolla en Uruguay, que ha hecho uso de las poblaciones locales disponibles, dando lugar a varios cultivares con amplia difusión. Para el mantenimiento y la multiplicación de plantas de genotipos de interés en el mejoramiento, como es el caso de genotipos androestériles que facilitan la realización de cruzamientos dirigidos, la introducción y multiplicación *in vitro* es un método apropiado. Numerosos trabajos buscaron la propagación clonal de genotipos de cebolla con una elevada tasa de multiplicación a partir de diferentes explantos. El cultivo de ápices del disco basal es una opción en el establecimiento de protocolos de multiplicación *in vitro* de cebolla. El objetivo de este trabajo fue ajustar un protocolo para la introducción y multiplicación *in vitro* de genotipos de cebolla a partir del disco basal, que garantice una rápida multiplicación y facilite su conservación, con vistas a su utilización en programas de mejoramiento. Se evaluaron tres tratamientos de desinfección (30, 60 y 90 minutos de inmersión en solución con hipoclorito de sodio), con 10 repeticiones por tratamiento. El experimento se realizó dos veces con plantas del cultivar “Canarita CRS” de 26 meses de edad provenientes de campo, y seis veces con plantas de los cultivares “Summit” y “Takstar” de 3 meses de edad provenientes de invernáculo. Los experimentos con el material de campo tuvieron alta proporción de infecciones en todos los tratamientos de desinfección, probablemente debido a la alta carga de microorganismos e infecciones endógenas. Con el material de invernáculo, el mejor tratamiento de desinfección fue el de 30 minutos de inmersión en hipoclorito de sodio, ya que rindió la mayor cantidad de plantas *in vitro* regeneradas y sin contaminaciones. Mayores tiempos de exposición al hipoclorito de sodio aumentaron la proporción de plantas muertas por oxidación del tejido. Por otro lado, se evaluó el efecto de cinco combinaciones de diferentes reguladores del crecimiento suplementados al medio de cultivo MS. Los tratamientos consistieron en 0.5 mg/l de ácido naftalen-acético (ANA) en todos los casos, en combinación con 0, 2 y 4 mg/l de 6-bencil amino purina (BAP), o con 2 y 4 mg/l de 6γ,γ-dimetilalilamino purina (2iP). El experimento se realizó tres veces, con 12 repeticiones por tratamiento,

con la población local “Siete Cáscaras”. Las evaluaciones se realizaron después de cuatro semanas. Los dos tratamientos con BAP tuvieron mejor calidad de plántulas, con mayor crecimiento de la parte aérea (longitud promedio de hoja) que otros tratamientos, aunque con menor crecimiento de raíces. Contrariamente, los tratamientos con 2iP tuvieron el menor crecimiento de la parte aérea, y la mayor longitud de raíz promedio. La tasa de multiplicación fue 1.0 en todos los casos. Se requieren trabajos adicionales con los genotipos de interés, que permitan ajustar la mejor combinación de reguladores de crecimiento para el mejor crecimiento de las plántulas, para aumentar la tasa de multiplicación, realizando las evaluaciones durante un mayor período de crecimiento en los medios de cultivo evaluados.

Palabras clave: *Allium cepa*; Cebolla; Micropropagación; In vitro; Reguladores del crecimiento.

8. SUMMARY

Onion (*Allium cepa* L.) is one of the main vegetable crops in Uruguay regarding the amount of produce, acreage and number of farmers involved. Onion breeding activities in Uruguay are ongoing from three decades ago, on the basis of available local landraces, and several cultivars were developed and adopted. In order to multiply and conserve interesting genotypes for breeding purposes such as male-sterile onion plants, which can facilitate crossings, *in vitro* introduction and multiplication is a suitable methodology. Several studies aimed to clonal propagation of onion genotypes from diverse explants with high multiplication rate. Multiplication from onion basal disc is an option for the establishment of protocols for *in vitro* onion multiplication. This research aimed to adjust a protocol for *in vitro* introduction and multiplication of onion genotypes using explants from the basal disc. This protocol should warrant a quick multiplication and conservation of onion genotypes towards utilization in breeding programmes. Three disinfection treatments were evaluated (immersion under sodium hypochlorite during 30, 60 and 90 minutes), with ten replication per treatment. The experiment was performed two times with the cultivar “Canarita CRS”, with 26 month old plants from a field seed crop, and six times with “Summit” and “Takstar” three month old plants cultivated under greenhouse. Experiments using field plants had high proportion of infections in all disinfection treatments, probably due to the high pressure of inoculum and endogenous infections. In experiments using greenhouse plants, immersion in Sodium hypochlorite solution during 30 minutes yielded the higher proportion of healthy and normally sprouted *in vitro* plants. Longer periods of immersion caused higher proportion of dead plants due to oxidation of plant tissues. In addition, the effects of five combinations of growth regulators added to MS growing medium on plant growth and multiplication rate were evaluated. Treatments consisted of 0.5 mg/l naphthalene-acetic acid (NAA) in all cases, in combination with 0, 2, and 4 mg/l of 6-benzil-amino-purine (BAP), or with 2 or 4 mg/l of 6y,y-dimethyl-amino-purine (2iP). The experiment was repeated three times using the local landrace “Siete Cáscaras” with 12 replications per treatment. Plant growth was evaluated after four weeks. Both treatments including BAP had better plant quality, as presented better leafy growth (longer average leaf length) than other treatments, though having also shorter roots.

Conversely, treatments with 2iP had the smaller leafy growth and the longest average root length. Multiplication rate was 1.0 for all evaluated treatments. Additional studies aiming to adjust the best combination of growth regulators are required in order to find the best onion plant growth and enhance multiplication rate. Future studies should consider genotypes of interest, and longer period of growth before evaluation.

Keywords: *Allium cepa*; Onion; Micropropagation; In vitro; Plant growth regulators.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. ABDELNOUR-ESQUIVEL, A.; ESCALANT, J.V. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. Turrialba, Costa Rica, CEE/CATIE/CIRAD. 38 p.
2. ARBELETCHÉ, P.; ARBOLEYA, J.; CAMPELO, E.; GALVÁN, G.; GONZÁLEZ IDIARTE, H. 1999. Caracterización del cultivo de cebolla en Uruguay In: Reunión Científica de Cebolla del Mercosur (3ª., 1999, s.l.). Memorias. s.n.t. pp. 65-86.
3. ARBOLEYA, J.; PAULLIER, J.; BERNAL, R. 2005. Tecnología para la producción de cebolla. Montevideo, INIA. 247 p. (Boletín de Divulgación no. 88).
4. BOHANEK, B. 2002. Doubled-haploid onion. In: Rabinowitch, H. D.; Currah, L. eds. *Allium* crop science; recent advances. s.l., CABI. s.p.
5. CAPOTE, A. 1996. Micropropagación de especies hortícolas de interés comercial para Cuba *Allium cepa* L cv. Caribe-71. Revista de la Facultad de Agronomía (La Plata). 101 (2) 1996: 193-199.
6. _____. ; FUNDORA, Z; PÉREZ, O. 2000. Estudio de la variabilidad inducida en células y plántulas de cebolla (*Allium cepa* L) cv. Caribe-71 regeneradas *in vitro*. Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT). Biotecnología Aplicada. 17:241-246.
7. DE MELO, P. E.; BURGER, K.; KIK, C. 2003a. *In vitro* propagation in onion, *Allium roylei* Stearn, a. *fistulosum* L. and derived populations using a multi-tissue approach and improved disinfection methods. s.n.t. s.p.
8. _____. 2003b. The root systems of onion and *Allium fistulosum* in the context of organic farming; a breeding approach. Ph.D. Thesis. Wageningen, The Netherlands. Wageningen University and Research Centre. 136 p.
9. DOGLIOTTI, S; GALVÁN, G. 2009. Bases fisiológicas del crecimiento y desarrollo del cultivo de cebolla (*Allium cepa* L.). Montevideo, Facultad de Agronomía. 19 p.
10. FERNANDEZ, F. 1982. El cultivo de meristemas para el saneamiento de clones de yuca. s.l., Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 45 p.

11. GALVÁN, G.; SOLLIER, S. 1994. Ocurrencia de andro-esterilidad en cebollas de Uruguay In: Congreso Nacional de Horticultura (5º., 1994, Montevideo). Resúmenes. Montevideo, s.e. s.p.
12. _____. ; GONZÁLEZ, H.; VILARÓ, F. 2005a. Estado actual de la investigación en poblaciones locales de hortalizas en Uruguay y su utilización en el mejoramiento. *Agrociencia*. 9(1-2): 115-122.
13. _____. 2005b. Mejoramiento genético por resistencia a enfermedades en cebolla. Montevideo, Fondo de Promoción de Tecnología Agropecuaria (FPTA). s.p.
14. GEORGE, E.F. 1993. *Plant propagation by tissue culture in practice*. 2th. ed. Wageningen, The Netherlands, Exergetic. v.1, 1561 p.
15. GONZÁLEZ, L.; GREMMINGER, H. 1996. Obtención de plantas de ajo colorado (*Allium sativum* L.) libres de virus mediante la técnica de cultivo de meristemos. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 102 p.
16. GREMMINGEN, H.; PAGLIANO, D.; VILARÓ, F. 1996. Ginogénesis in vitro de materiales de cebolla In: Congreso Nacional de Horticultura (8º., 1996, Montevideo). Resúmenes. Montevideo, s.e. p.1.
17. JONES, H. A.; EMSWELLER, S. L. 1937. A male sterile onion. *Proceedings American Society for Horticultural Sciences*. 34:582-585.
18. KELLER, E. 1996. Interspecific crosses of onion with distant *Allium* species and caracterizacion of the presumed hybrids by means of flow cytometry, karyotype analysis and genomic in situ hybridization. *Theoretical and Applied Genetics*. 92: 417-424.
19. KHRUSTALEVA, L.I.; C. KIK. 1998. Cytogenetical studies in the bridge cross *Allium cepa* x (*A. fistulosum* x *A. roylei*). *Theoretical and Applied Genetics*. 96: 8-14.
20. KIL SUN YOO; PIKE, L.M.; GREG COBB, B. 1990. Promotion of in vitro leaf growth of inner scales excised from dormant onion bulbs. *HortScience*. 25 (2): 228-229.
21. LAGO, H.; MORIYAMA, S.; MANEBTE, J. 1997. Optimización de un medio de cultivo de meristemas para la propagación in vitro de *Solanum tuberosum* variedad favorita. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 81 p.

22. LUCAS, C. E. A. 2004 Biotecnología vegetal. Aplicaciones del cultivo de meristemas apicales de tallo. (en línea). s.n.t. Consultado mar. 2010. Disponible en <http://www.revistaciencias.com/publicaciones/EpZZpVZZyEPXCWYYqP.php>.
23. MATEO BOX, J.M. 1988. Biotecnología, agricultura y alimentación. Madrid, Mundi-Prensa. 255 p.
24. MOHAMED-YASSEEN, Y.; SPLITTSTOESSER, W. E.; LITZ, R. E. 1993. *In vitro* bulb formation and plant recovery from onion inflorescences. HortScience. 28 (10): 1052.
25. MONTALDI, E. 1995. Principios de fisiología vegetal. s.l., Ediciones del Sur. 298 p.
26. MONTGOMERY, D.C. 2002. Diseño y análisis de experimentos. 2ª. ed. México, D.F., Limusa. 686 p.
27. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 115: 473-497.
28. PATHAK, C.S. 1997. A possible new source of male sterility in onion. Acta Horticulturae. no. 433: 313-316.
29. PIERIK, R.L.M. 1987. *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht, Martinus Nijhoff. 344 p.
30. QUINTANA, M.; ROBLEDO, A. 2005. Regeneración *in vitro* de plantas de cebolla (*Allium cepa* L.). Agrociencia (México). 39: 647-655.
31. ROCA, W. M.; MROGINSKI, L.A. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura; fundamentos y aplicaciones. s.l., CIAT. 969 p.
32. RODRIGUES, B.; PEREIRA, J.; DE SOUZA, C. 1996. Propagação "*in vitro*" de cebolla (*Allium cepa* L.) a partir de teçidos de bulbos. Bragantia. 55: 19-28.
33. SALISBURY, F.; ROSS, C. 1994. Fisiología vegetal. México, D.F., Grupo Editorial Ibero-americana. 759 p.
34. SHIGYO, M.; KIK, C. 2007. Onion. In: Prohens, J.; Nuez, F. eds. Vegetables. Berlin, Springer Verlag. v.2, s.p.
35. STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. 1985. Bioestadística, principios y procedimientos. Bogotá. McGraw – Hill. 622 p.

36. URUGUAY. MINISTERIO DE GANADERÍA, AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCION DE INVESTIGACIONES ESTADISTICAS AGROPECUARIAS. 2008. Anuario Estadístico Agropecuario 2008. (en línea). Montevideo. 206 p. Consultado ago. 2010. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/portal/hgxpp001.aspx?7,5,41,O,S,0,MNU;E;27;1;MNU;>
37. VILARÓ, F.; VICENTE, E.; PEREYRA, G.; RODRÍGUEZ, G. 2005. Capítulo III. Cultivares y mejoramiento genético en cebolla. Montevideo, INIA. pp. 31-42. (Boletín de Divulgación no. 88).
38. VOSS, R. 1979. Onion production in California. s.n.t. 4907 p.