

Estudio de la variabilidad inducida en células y plántulas de cebolla (*Allium cepa*, L.) cv. Caribe-71 regeneradas *in vitro*

Amelia Capote Rodríguez, Zoila Fundora Mayor, Odalys Pérez Díaz

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT).
Calle 1 esq. 2, Santiago de Las Vegas, Ciudad de La Habana, Cuba.
Telf.: (53-7) 57 9010, 57 9308; Fax: (53-7) 57 9014; E-mail: inifat@ceniai.inf.cu

RESUMEN

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. También se evaluaron, mediante estudios citogenéticos y bioquímicos (isoenzimas peroxidadas), las posibles variaciones que se pudieran presentar durante el período de cultivo *in vitro*. Los resultados obtenidos muestran que, en las células presentes en los callos, se observan diferentes niveles de ploidía en dependencia del tipo y concentración de los reguladores adicionados. Las plantas regeneradas a partir de callos muestran diferencias en algunos caracteres morfológicos relacionados con los rendimientos, pero mantienen su condición diploide, lo que evidencia la existencia de un proceso de selección en la diferenciación celular. Los patrones isoenzimáticos muestran variaciones en los callos y las plántulas regeneradas en relación con el material original. Se sugiere utilizar estos resultados en investigaciones encaminadas a la aplicación de las técnicas biotecnológicas a la selección de una nueva variabilidad genética, y profundizar en estos estudios mediante el empleo de otras técnicas moleculares que permitan hacer un análisis más detallado del genoma de estas plantas.

Palabras claves: *Allium cepa*, cebolla, inestabilidad genética, variación somaclonal

Biotecnología Aplicada 2000;17:241-246

ABSTRACT

Study of the Variability Induced in *In Vitro* Cells and Regenerated Plants of Onion (*Allium cepa*, L.) cv. Caribe-71. The effect of different growth regulators on callus induction and growth from segments of young leaves, was studied. Plant regeneration from these calli was also studied. Variations that might be present during the *in vitro* culture period were evaluated by means of cytogenetic and biochemical (peroxidase patterns) studies. The results showed that callus cells have different ploidy levels depending on the type and concentration of the regulators added. Plants regenerated from calli showed differences in their morphological traits but kept their diploid condition, which evidenced the existence of a selection process during cell differentiation. Peroxidase patterns showed variations in the calli and the regenerated plants in relation to the original material. We suggest the use of these results in research works concerning the application of biotechnological techniques to obtain a new genetic variability, as well as the continuation of these studies using other molecular techniques that enable us to gain insights into the genome of these plants.

Keywords: *Allium cepa*, genetic instability, onion, somaclonal variation

Introducción

La cebolla (*Allium cepa*, L.) es una especie hortícola de gran importancia económica para Cuba. Sin embargo, debido a las dificultades que existen para su cultivo, se realizan numerosos esfuerzos con el objetivo de buscar nuevas variedades que se adapten mejor a las condiciones climáticas de ese país caribeño, y que garanticen rendimientos más elevados.

El mejoramiento genético de este cultivo está limitado cuando se usan las técnicas tradicionales, debido a que no todos los cultivares producen semillas y a la existencia de barreras de incompatibilidad con las variedades más rústicas, portadoras de los genes de resistencia a enfermedades y de adaptación ambiental [1].

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 [2], como es el caso de la cebolla [3]. Por esta razón, el cultivo de tejidos y células *in vitro* constituye una alternativa en los programas de mejora-

miento genético, puesto que durante este período se generan modificaciones genéticas heredables denominadas variaciones somaclonales [4]. Estas variaciones posibilitan la obtención de una nueva variabilidad genética [5].

Se ha planteado que estas variaciones dependen de condiciones preexistentes en el explante inicial y/o de factores externos como la composición de los medios de cultivo, sobre todo el tipo y la concentración de los reguladores del crecimiento adicionados [6].

Se ha observado la variación en el número de cromosomas en los cultivos *in vitro* [7]. No obstante, se ha estudiado poco el cariotipo de las células en el momento de su cultivo, su cariotipo posterior como células libres o callos, y las plántulas producidas por éstos [8].

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de los reguladores del crecimiento en la inducción de callos y la regeneración de plantas, así como estudiar las posibles variaciones que se pueden encontrar en las células y las plántulas de cebolla cultivadas *in vitro*.

1. Muñoz L, Prats A, Brito G. Mejoramiento de hortalizas para condiciones tropicales. En: Rodríguez Nodals A, Martínez Viera R, editores. Noventa años de la Estación Experimental Agronómica de Santiago de las Vegas. La Habana: Editorial Academia; 1994. p.57-70.

2. Karp A. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica* 1995; 85:295-302.

3. Falavigna A, Hussey G. Origin of adventitious shoots from *Allium cepa* and the effect of daylength. *John Innes Inst Ann Rep* 1978;52:75.

4. Larkin PJ, Scowcroft WR. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet* 1981;60:197-214.

5. Skirvin RM. Natural and induced variation in tissue culture. *Euphytica* 1978;27:241-66.

Materiales y métodos

Material vegetal

Para desarrollar este trabajo, se seleccionó el cv. Caribe-71 por ser la variedad comercial de mayor distribución en el país, debido a su adaptación a las condiciones climáticas y a sus rendimientos aceptables.

Obtención de callos

Se utilizaron como explantes segmentos de hojas inmaduras, los cuales fueron lavados con agua corriente y detergente comercial. Posteriormente y en condiciones asépticas, fueron sumergidos en etanol 70% durante 10 min y colocados en una solución de hipoclorito de sodio 5% durante 20 min.

Una vez concluida la desinfección, se lavaron tres veces en agua destilada estéril y se cultivaron en medio MS [9] suplido con sacarosa 30 g/L y diferentes combinaciones de auxinas y citoquininas (Tabla 1).

En todos los medios de cultivo utilizados, se ajustó el pH a 5,8 en un pH metro digital modelo MV 780 (PRÄCITRONIC, Alemania), antes de añadir el agar (7 g/L). Los medios de cultivo se esterilizaron en un autoclave a 121 °C y 1,2 atm de presión, durante 20 min.

Cada tratamiento tuvo 24 réplicas. Los cultivos fueron mantenidos en la oscuridad por un período de 90 días a una temperatura de 25 ± 2 °C. Durante ese tiempo, se realizaron subcultivos en el mismo medio de cultivo cada 30 días, con el propósito de lograr su establecimiento óptimo.

El crecimiento relativo de los callos se determinó después de los 90 días de cultivo mediante la evaluación del incremento de peso en relación con el peso inicial de los explantes (aproximadamente 0,05 g), y se expresó en por ciento según la siguiente escala de valores: 0, no crecimiento (0%); 1, aumento del tamaño del explante (1%-25%); 2, poco crecimiento (26%-50%); 3, crecimiento medio (51%-75%); y 4, crecimiento abundante (76% o más).

Regeneración de plantas

Los callos obtenidos en el medio de mayor crecimiento (MS + picloram 0,1 mg/L y 6 γ , γ -dimetilalilaminopurina [2iP] 1 mg/L) fueron trasplantados al mismo medio mineral suplido con diferentes reguladores del

crecimiento (Tabla 1), con el objetivo de inducir la regeneración de brotes.

Los cultivos fueron mantenidos en un fotoperíodo de 14 h luz a una intensidad luminosa de 2 000 lux y a una temperatura de 25 ± 2 °C, por un período de 90 días, tiempo después del cual se evaluó la aparición de brotes, zonas nodulares verdes y raíces en un total de 15 réplicas.

Estudio de las variaciones inducidas en células y plantas regeneradas *in vitro*

Estudios citogenéticos. Se realizaron diferentes estudios con los callos y las plantas regeneradas *in vitro*, con el propósito de determinar los cambios en los niveles de ploidía.

Los callos de 90 días fueron tratados previamente con una solución de 8-hidroxiquinolina 0,002 M durante 4 h a temperatura ambiente, fijados en etanol-ácido acético (3:1) e hidrolizados con HCl 1 N. El aplastado se realizó en orceína acética y se contó el número de células en metafase y el número de cromosomas por célula. Se evaluó un total de 10 preparaciones por variante.

Se estudió, además, el número de cromosomas de las células de los ápices radiculares de las plantas regeneradas *in vitro* a partir de callos, con el propósito de determinar el nivel de ploidía de las plantas obtenidas. Se evaluó un total de 50 plántulas seleccionadas al azar.

Estudio de los caracteres agromorfológicos. El estudio de los caracteres agromorfológicos se realizó con el objetivo de detectar las posibles desviaciones fenotípicas de las plantas regeneradas. Para ello, se estudiaron diferentes caracteres en dos grupos de plantas: plantas regeneradas *in vitro* y plantas obtenidas a partir de semillas del cultivar original. Ambos grupos de plantas fueron sembrados en iguales condiciones y con las mismas atenciones culturales.

Se evaluaron los siguientes caracteres: sabor, color externo e interno del bulbo, peso, diámetro y altura del bulbo, número de yemas y número de catafilos.

Se analizó un total de 35 plantas por variante y los resultados individuales se evaluaron estadísticamente mediante un análisis factorial discriminante, según el programa estadístico STAT-ITCF con el empleo de la distancia generalizada de Mahalanobis.

Estudio de los patrones isoenzimáticos. Para los análisis electroforéticos de las isoperoxidasas, se utilizaron las hojas de las plántulas germinadas *in vitro* a partir de semillas (plantas controles), los callos crecidos en el medio de mayor crecimiento (MS + 0,1 mg/L picloram y 1 mg/L 2iP) y las hojas de plántulas regeneradas *in vitro* (MS + 2,4 D 0,01 mg/L y KIN 5 mg/L). En todos los casos se utilizó material vegetal de cuatro semanas de edad.

La extracción se realizó macerando el material vegetal (2 g) en tampón fosfato 0,1 M con sacarosa 10%, pH 7,0, en una relación de 1 mL de tampón por cada gramo de tejido para las hojas (1:1 v/p) y 2 mL de tampón por cada gramo para los callos (1:2 v/p). Las corridas electroforéticas se realizaron en geles de poliacrilamida 5%. Se aplicaron 10 μ L de muestra por pocillo.

Se empleó un sistema electroforético horizontal que permite la separación simultánea de las bandas aniónicas

Tabla 1. 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)	BAP (0; 0,1 y 1 mg/L)
AIB (1 y 2 mg/L)	KIN (0; 0,1 y 1 mg/L)
ANA (1 y 2 mg/L)	2iP (0; 0,1 y 1 mg/L)
Picloram (0,1 y 0,5 mg/L)	Zeatina (0; 0,1 y 1 mg/L)
Regeneración de plantas	
2,4-D (0,01 mg/L)	KIN (2 y 5 mg/L) y BAP (2 y 5 mg/L)
ANA (0,05 mg/L)	KIN (2 y 5 mg/L) y BAP (2 y 5 mg/L)
AIA (0,05 mg/L)	KIN (2 y 5 mg/L) y BAP (2 y 5 mg/L)
Picloram (0,1 mg/L)	2iP (0,5 y 1 mg/L) y BAP (2 y 5 mg/L)
2,4-D, ácido 2,4 diclorofenoxiacético; AIB, ácido indolbutírico; ANA, ácido naftalenacético; KIN, 6-furfurilaminopurina; BAP, 6-bencilaminopurina; 2iP, 6- γ , γ -dimetilalilaminopurina; picloram, ácido 4-amino 3,5,6-tripicolínico.	

6. George EF. Variation in cultures and regenerated plants. In: Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology. Edington, Wilts: Exegetics Ltd.; 1993. p.67-91.

7. Kaepler SM, Phillips RL, Olhofft P. Molecular basis of heritable tissue culture-induced variation in plants. In: Jain SM, Brar DS, Ahloowalia BS, editors. Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Vol. 32. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1998. p.465-84.

8. Krikorian AD. Propagación clonal *in vitro*. En: Roca WM, Mroginski LA, editores. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Cali, Co-

y catiónicas. El tiempo de corrida fue aproximadamente de 5 h con una intensidad de corriente de 1 mA por pocillo. Tanto la extracción como la electroforesis se llevaron a cabo a una temperatura de 4 °C.

La tinción se realizó en una solución de bencidina 25% y peróxido de hidrógeno 0,01%, y los zimogramas se confeccionaron a partir de la medición de la posición de la bandas con respecto al punto de aplicación (movilidad), y de su intensidad.

Resultados y Discusión

Obtención de callos y regeneración de las plantas

Cuando se analizó la respuesta en el crecimiento según la composición de los diferentes reguladores en los medios de cultivo (Figura 1), se observó que la adición de 2,4-D 2 mg/L estimuló la formación de callos, siempre que estuvo en presencia de 2iP o zeatina. Sin embargo, en general, el crecimiento de los callos fue deficiente en presencia de esta auxina.

Con la adición de ácido naftalenacético (ANA), se obtuvo una respuesta similar a la del 2,4-D, pero se indujo la regeneración de raíces en los callos. Esto confirma que esta auxina tiene una excelente capacidad de inducir la rizogénesis *in vitro* [10], aspecto que no es deseado cuando se quiere lograr un crecimiento óptimo de los callos.

Las mejores respuestas se obtuvieron con la adición de picloram a baja concentración (0,1 mg/L). Esta auxina resultó ser la más efectiva para inducir un crecimiento óptimo de los callos, el cual se estimula con la adición de 2iP al medio. Se obtuvieron, además, callos altamente friables y de coloración cremosa, características que están asociadas a una mayor capacidad de regeneración de plantas.

Se plantea que la eficiencia del picloram en la inducción de callos es comparable a la del 2,4-D en cuanto a la inducción del crecimiento, y superior a éste en cuanto a lograr la friabilidad de los callos y la subsecuente regeneración de plantas de *Allium cepa* [11] y *Allium trifoliatum* subsp. *hirsutum* [12].

El picloram es una auxina sintética muy eficiente para el cultivo de tejidos vegetales, puesto que ofrece ciertas ventajas en relación con el 2,4-D por ser soluble en agua, menos tóxica por su efectividad a concentraciones más bajas y, en último lugar, por ofrecer un mayor potencial para la regeneración de plantas a partir de callos [13].

En cuanto a las citoquininas empleadas, el 2iP y el BAP estimulan, en mayor medida, el crecimiento de los callos cuando están en presencia de auxinas en el medio de cultivo.

En la Tabla 2 se muestra la aparición de brotes, zonas nodulares verdes y raíces según los diferentes medios de cultivo utilizados. La respuesta obtenida está asociada al tipo de regulador del crecimiento adicionado.

La diferenciación de brotes ocurrió en los medios suplidos con KIN y BAP como citoquininas, aunque con menor frecuencia. Por otra parte, la adición de 2iP no fue efectiva debido a que no estimuló la formación de brotes ni de zonas nodulares verdes. La formación de estas zonas fue estimulada por la presencia de ANA; sin embargo, no fue posible su desarrollo posterior a brotes.

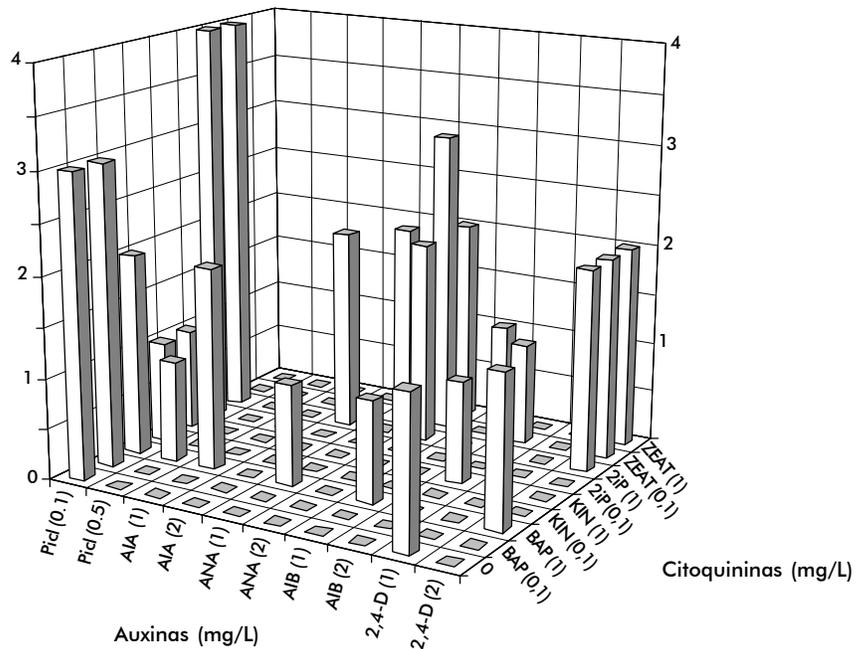


Figura 1. Inducción de callos de cebolla cv. Caribe-71 en diferentes medios de cultivo bajo condiciones de oscuridad continua.

Tabla 2. Aparición de brotes, zonas nodulares verdes y raíces para los diferentes medios de organogénesis utilizados.

Medios de cultivo		Zonas verdes nodulares	Brotes	Raíces
Auxinas	Citoquininas			
2,4-D 0,01 mg/L	2 mg/L KIN	---	***	*
	5 mg/L KIN	---	***	*
	2 mg/L BAP	---	*	***
	5 mg/L BAP	---	*	***
ANA 0,05 mg/L	2 mg/L KIN	***	**	**
	5 mg/L KIN	***	**	*
	2 mg/L BAP	***	*	*
AIA 0,05 mg/L	5 mg/L BAP	---	*	---
	2 mg/L KIN	---	---	---
	5 mg/L KIN	**	*	---
	2 mg/L BAP	---	---	---
Picloram 0,1 mg/L	5 mg/L BAP	---	---	---
	1 mg/L BAP	***	---	---
	0,5 mg/L 2iP	---	---	---
	1 mg/L 2iP	---	---	---

*(1-5); **(5-10); ***(más de 10)

Según los resultados obtenidos, la adición de KIN a concentraciones altas (2 y 5 mg/L), en combinación con 2,4-D a una concentración muy baja (0,01 mg/L), genera el medio más eficiente para la regeneración de plantas. Sin embargo, aún en los medios de mejor comportamiento, el número de brotes regenerados es bajo (10 a 15 brotes/callos).

Se detectó, además, que la capacidad de regeneración disminuye a medida que aumenta el número de subcultivos (Figura 2), lo que pudiera deberse a que, después de cierto período de cultivo, el potencial morfogénico del callo disminuye. Este hecho está asociado a cambios genéticos que se producen en las

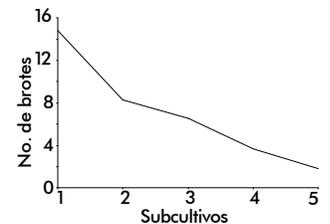


Figura 2. Disminución de la regeneración de brotes en dependencia del número de subcultivos realizados.

células en cultivo, puesto que esta variación es influida, entre otros factores, por la duración del período de cultivo [14].

Eady *et al.* [15] demostraron que se pueden obtener callos de cebolla altamente embriogénicos con la adición de 2,4-D y picloram al medio de cultivo. Sin embargo, una característica de los protocolos publicados hasta el momento para esta especie, es el número relativamente bajo de brotes formados independientemente del explante utilizado, lo cual ha motivado, entre otras cosas, la ausencia de un protocolo de transformación genética estable para este cultivo [16].

La regeneración eficiente de callos de monocotiledóneas ha mostrado ser dependiente de varios factores, como el tipo de explante, el genotipo, el medio de cultivo y el tipo de callo obtenido [17]. En el caso específico de la cebolla, se plantea que la regeneración de brotes depende de numerosos factores, de los cuales el más importante es el nivel de reguladores del crecimiento presentes en el medio de cultivo. Para este proceso se necesitan concentraciones más altas de citoquininas que de auxinas [18].

Estudios de la variación inducida en los callos y las plantas regeneradas

Estudios de los caracteres citogenéticos. Las células presentes en los callos provenientes de medios de inducción, muestran una alteración en los niveles de ploidía en dependencia del tipo de reguladores adicionales (Figura 3).

En los callos obtenidos en medios de cultivo con 2,4-D como auxina, se obtuvo un gran número de células tetraploides ($2n = 2x = 32$ cromosomas), poliploides (más de 60 cromosomas) y células con hasta 12 nucléolos, lo que indica que, como mínimo, triplicaron sus cromosomas. La presencia de estas células aumentó cuando se combinó con el 2iP.

Entre los reguladores del crecimiento, el 2,4-D—auxina sintética utilizada comúnmente en los medios de cultivo— ha demostrado tener un gran efecto mutagénico en las células meristemáticas, las cuales sufren cambios sustanciales en la expresión génica [19]. Se ha planteado que el 2,4-D estimula generalmente la síntesis de ADN, lo que puede conducir a un proceso de endorreplicación y, por otra parte, reduce el índice

mitótico y aumenta el sobrecruzamiento mitótico. Los dos últimos fenómenos incrementan la poliploidía en las células cultivadas [20].

Por otra parte, las hormonas involucradas en la senescencia celular, entre ellas las citoquininas, desempeñan un papel importante en la variación inducida, debido a que el proceso de senescencia está asociado con la estabilidad del genoma [7]. Ésta pudiera ser la causa de la pérdida del potencial organogénico después de un período prolongado de cultivo, puesto que esta pérdida está asociada a una acumulación de cambios genéticos que ocurren en las células en cultivo [21].

Sin embargo, en los callos crecidos en medios suplidos con picloram, se encontró que la mayor cantidad de células mantienen su condición diploide ($2n = 2x = 16$ cromosomas). La adición de BAP 0,1 mg/L fue lo que estimuló la aparición de células tetraploides en un mayor por ciento (25,93%). No hay duda de que las aberraciones cromosómicas, especialmente los cambios en los niveles de ploidía, son comunes en las células y los tejidos cultivados en condiciones asépticas [22].

Aún no se conoce bien el modo de acción de los reguladores del crecimiento sobre los cambios en los niveles de ploidía. Según Bayliss [23], no hay un efecto directo de los componentes del medio que lleve a una inestabilidad cromosómica, sino que ésta resulta del crecimiento desorganizado de los callos, que es controlado por los reguladores del crecimiento.

El balance hormonal es crítico para el crecimiento celular y la estabilidad del genoma. Se ha demostrado que el proceso de dediferenciación celular está acompañado de un cambio en los niveles de metilación [24], así como de una variación en la talla del genoma por amplificación o disminución de las secuencias repetitivas [25]. También se plantea que la aparición y el grado de ploidía obtenido *in vitro*, puede ser el resultado de un equilibrio entre la constitución genética de la especie y la composición del medio de cultivo. Estos resultados indican que la presión de selección del medio de cultivo puede llevar a la manifestación del control genético en el comportamiento de los cromosomas, de una manera diferencial según la especie [26].

Se ha observado que el cariotipo varía en las células cultivadas, las plantas regeneradas y su progenie en numerosas especies, incluidas variaciones en el reordenamiento de los cromosomas como los cambios en los niveles de euploidía y aneuploidía. Esta última afecta la capacidad de las células para regenerar plantas, particularmente en las especies diploides [7]. A nivel molecular, estas mutaciones están relacionadas frecuentemente con los procesos de endorreplicación o amplificación del ADN. Ambos procesos traen como consecuencia el aumento del contenido de ADN que se puede producir durante los procesos morfogénicos, o bien en condiciones de estrés [27].

En los últimos años, ha surgido una teoría que considera al genoma vegetal en un estado de flujo constante, que se puede producir entre los ciclos mitótico o meiótico. Esta teoría postula que los mecanismos por medio de los cuales se producen estas variaciones, incrementan mil veces su frecuencia de aparición en condiciones de cultivo de tejidos. Esta fluidez permitiría la modulación rápida del genoma frente a situaciones de estrés y sería el mecanismo por medio del

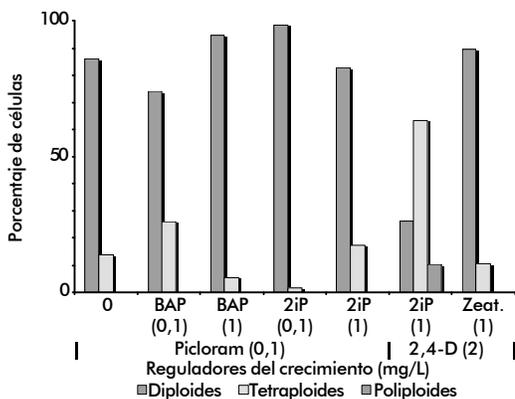


Figura 3. Variaciones en el número de cromosomas en las células de los callos cultivados en diferentes medios de cultivo.

lombia: CIAT; 1991. p.95–125.

9. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 1962;15:473–97.

10. Kartha KK, Gamborg OL, Shyluk JP, Constabel F. Morphogenetic investigation on *in vitro* leaf cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*) and high frequency plant regeneration. *Z Pflanzenphysiol* 1976;77(4):292–301.

11. Phillips GC, Luteyn KJ. Effects of picloram and other auxins on onion tissue cultures. *J Amer Soc Hortic Sci* 1983;108: 948–53.

12. Viterbo A, Rabinowitch HD, Altman A. Plant regeneration from callus cultures of *Allium trifoliatum* subsp. *hirsutum* and assessment of genetic stability by isozyme polymorphism. *Plant Breeding* 1992;108: 79–83.

13. Collins GB, Vian WE, Phillips GC. Use of 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid as an auxin source in plant tissue cultures. *Crop Sci* 1978;18: 285–8.

14. Karp A. On the current understanding of somaclonal variation. *Oxford Surveys of Plant and Molecular Biology* 1991; 7:1–58.

15. Eady CC, Butler RC, Suo Y. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo cultures of onion (*Allium cepa* L.). *Plant Cell Rep* 1998;18:111–6.

16. Luthar Z, Bohanec B. Induction of direct somatic organogenesis in onion (*Allium cepa* L.) using a two-step flower or ovary culture. *Plant Cell Rep* 1999; 18:797–802.

17. Novák FJ. *Allium* tissue culture. In: Rabinowitch HD, Brewster JL, editors. Onions and allied crop. Vol. 1. Boca Raton (FL): CRC Press, Inc.; 1990. p234–50.

18. Novák FJ, Havel R, Dolezel J. Onion, garlic and leek (*Allium* species). In: Bajaj YPS, editor. Biotechnology in agriculture and forestry. Vol. 2: Crop I. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1986. p.387–404.

19. Pavlica M, Nagy B, Papes D. 2,4-D causes chromosome and chromatin abnormalities in plant cells and mutation in cultured mammalian cells. *Mutat Res* 1991;263:77–82.

20. Swartz HJ. Post culture behavior: genetic and epigenetic effects and related problems. In: Debergh PC, Zimmerman RH, editors. Micropropagation. Technology and application. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1991. p.484.

21. Smith SM, Street HE. The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) are serially subcultured. *Ann Bot* 1974;38:223–41.

22. Lee M, Phillips RL. The chromosomal basis of somaclonal variation. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1988; 39:413–37.

23. Bayliss MW. Chromosomal variation in plant tissue culture. Perspectives in plant cell and tissue culture. *Int Rev Cytol* 1980;Suppl IIA:113–4.

cual los vegetales se adaptan a diferentes condiciones. Por otra parte, la variación somaclonal aparece como consecuencia de este fenómeno [22].

Estudio de los caracteres morfológicos. Al analizar los resultados obtenidos cuando se evaluaron los caracteres morfológicos de las plantas regeneradas y del cultivar original, se observó que la función discriminante entre ambos grupos indica que las vitroplantas difieren significativamente de las plantas del cultivar original (Tabla 3).

El por ciento de individuos bien calificados fue 74,6% y las mayores diferencias entre ambos grupos de plantas se detectaron fundamentalmente en el peso y diámetro de los frutos, parámetros que están estrechamente vinculados entre sí y determinan el rendimiento en este cultivo [28].

Si se analiza el gráfico correspondiente a la distribución de los individuos de acuerdo con los valores de sus funciones discriminantes (Figura 4), se puede apreciar que existe una dispersión muy grande del valor de las funciones dentro de cada grupo con respecto a los valores promedios de cada uno (G_1 y G_2), lo que indica una variación en los caracteres estudiados.

Por otra parte, los caracteres cualitativos evaluados, como color externo e interno del bulbo y su sabor, se mantuvieron estables para los dos grupos de plantas analizadas. Sin embargo, cuando se realizó el análisis de los cromosomas en los ápices radiculares de las plántulas regeneradas a partir de callos, se observó que éstas mantuvieron su condición diploide. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Vallés *et al.* [29], quienes confirmaron que hay una selección *in vitro* de las células normales genéticamente para la formación de embriones somáticos, y que las plantas que se obtienen a partir de ellos son generalmente estables.

Se ha reportado que la selección en el proceso de diferenciación desempeña un papel importante. Esto se determinó al comparar el número de cromosomas en las células del tejido de los callos y el nivel de ploidía de las plantas regeneradas, lo que pudiera ser la causa del desarrollo *in vitro* de plantas diploides a partir de callos que contienen células poliploides. Por esta razón, se plantea que solamente las células normales desde el punto de vista citológico retienen la capacidad de regeneración *in vitro* [30].

Para muchas especies del género *Allium* se ha reportado inestabilidad cariotípica de los callos cultivados, así como modificaciones en las plantas regeneradas a partir de ellos [17]. Sin embargo, la variación genética que se produce en los tejidos somáticos no se detecta fácilmente debido a la ausencia de marcadores fenotípicos adecuados en los cultivos de tejidos.

La inestabilidad genética *in vitro* tiene grandes desventajas, entre ellas la incapacidad para regenerar un gran número de plantas idénticas (propagación clonal de genotipos), la disminución de la capacidad de regeneración, la regeneración de plantas estériles y la pérdida de marcadores genéticos [31], pero, a su vez, es de gran importancia cuando se quiere seleccionar nuevos individuos con características deseadas [2].

Estudio de la variación inducida por análisis de patrones de peroxididas

Por permitir el estudio directo del producto de los genes, el análisis isoenzimático constituye un método adicional para estudiar los cambios genéticos que ocu-

Tabla 3. Resultados del análisis discriminante realizado para los caracteres morfológicos de las plantas regeneradas y el cultivar original.

Valor propio	Inerte	Pseudo F	Wilks	gdl	Probabilidad (%)	Correlación
0,6668	100,0%	45,35	33,46	5	0,00	0,4001
Vectores propios						
Variables	Eje 1					
Peso	<u>1,1761</u>					
Diámetro	<u>0,9842</u>					
Altura	-0,4426					
Número de yemas	0,2279					
Número de catáfilos	0,1198					
Valores medios de los caracteres morfológicos evaluados						
Grupo		Peso	Diámetro	Altura	Número de yemas	Número de catáfilos
(1) Plantas regeneradas	Media	45,806	3,854	2,280	1,771	5,714
	DE	23,151	0,995	0,500	0,539	1,084
(2) Plantas obtenidas a partir de semillas	Media	39,640	3,506	2,586	1,571	5,257
	DE	18,349	0,698	0,372	0,599	0,936

DE, desviación estándar. Los valores subrayados corresponden a las variables que más contribuyen a la diferencia entre grupos.

ren durante el crecimiento y almacenamiento de los cultivos *in vitro*. Por esa razón, las diferencias en los patrones de bandas de isoenzimas entre los tejidos del cultivar original y los cultivados *in vitro*, pueden ser utilizadas para detectar tales cambios [32].

La Figura 5 muestra una representación esquemática de los patrones de isoperoxididas correspondientes a los diferentes tejidos estudiados. Al analizar los patrones obtenidos, se observa, en general, que hay variación en el número e intensidad de las bandas para los callos y hojas de las plántulas regeneradas *in vitro*, en relación con el patrón obtenido para las hojas de las plantas del cultivar original.

Para las hojas de las plántulas obtenidas a partir de semillas aparecen tres bandas solamente. De ellas, las bandas A_2 y C_1 aparecen en los demás tejidos estudiados (callos y plántulas regeneradas *in vitro*), aunque varían cuantitativamente en los diferentes tejidos y se observa la mayor intensidad en los callos. Por otro lado, la banda A_1 aparece solamente en las plantas obtenidas a partir de semillas y su ausencia es general en las plantas regeneradas y los callos.

24. Smulders MJ, Rus-Korttekaas E, Vosman B. Tissue culture-induced DNA methylation polymorphisms in repetitive DNA of tomato calli and regenerated plants. *Theor Appl Genet* 1995; 91:1257-64.

25. Arnholt-Schmitt B, Herterich S, Neumann KH. Physiological aspects of genome variability in tissue culture. I. Growth phase-dependent differential DNA methylation of the carrot (*Daucus carota* L.) during primary culture. *Theor Appl Genet* 1995;91:809-15.

26. Chandra S. Chromosomal variations in the callus tissues of *Allium tuberosum* and *Allium cepa*. *Protoplasma* 1980; 102(1/2):171-6.

27. Escandón AS. Estudio comparado de la variación en la cantidad y calidad de ADN durante la morfogénesis *in vitro* de *Oxalis glaucifolia* y *O. rhombico-ovata*. [Tesis Univ.] Buenos Aires: Facultad de Farmacia y Bioquímica; 1990.

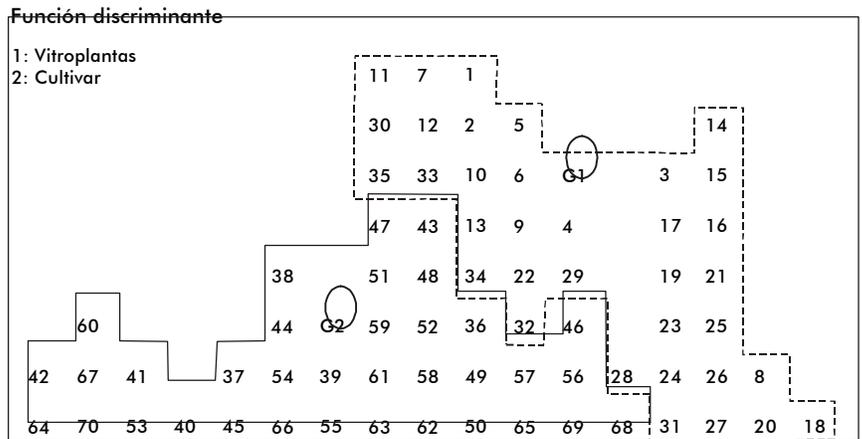


Figura 4. Representación gráfica de los individuos de ambos grupos (cultivar original y plantas regeneradas), según el análisis factorial discriminante realizado para los caracteres agromorfológicos evaluados.

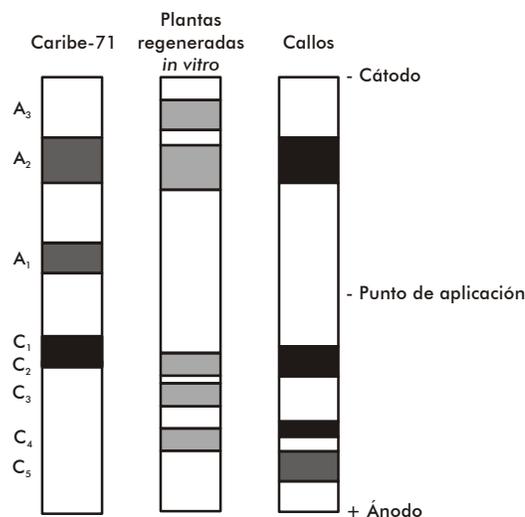


Figura 5. Patrones electroforéticos de las peroxidases en los callos y las hojas de las plantas regeneradas *in vitro*.

Vale la pena destacar que los patrones obtenidos para los cultivos *in vitro* muestran muchas más bandas que el cultivar original; sin embargo, resulta interesante que sólo tienen en común las bandas que también están presentes en el cultivar original (A_2 y C_1). Las bandas A_3 , C_2 y C_4 sólo aparecen en las plantas regeneradas *in vitro*, mientras que las bandas C_3 y C_5 solamente están presentes en los tejidos de los callos. En los callos las bandas también son más intensas, lo que muestra una mayor cantidad de isoenzimas presentes en este tejido.

Estos resultados coinciden con lo planteado por Sabir *et al.* [33], quienes señalan que el estudio de las proteínas y las enzimas para caracterizar la variación somaclonal se puede resumir en tres categorías: movilidad electroforética alterada, pérdida o ganancia de bandas, y niveles alterados de proteínas específicas (diferente intensidad en las bandas). La función de las isoenzimas peroxidases ha sido muy discutida en la literatura por su relación con los mecanismos de resistencia a factores bióticos y/o abióticos [34], y también se ha utilizado amplia-

mente en estudios de variación somaclonal en callos y plantas regeneradas [35].

En la actualidad, existe gran variedad de métodos moleculares disponibles para caracterizar el genoma vegetal, y tienen, a su vez, un enorme valor en las investigaciones relacionadas con la detección de la variación somaclonal [36]. Entre estos trabajos, se pueden citar los estudios basados en diferentes técnicas como los marcadores RAPD [37], RFLP [25], los microsatélites [38] y AFLP [39].

La presencia de la variación genética inducida durante el cultivo *in vitro*, tiene una consideración especial en el contexto de la transformación genética. No obstante, esta situación se complica debido a que en plantas obtenidas mediante cultivo de tejidos hay tantos informes de estabilidad como de inestabilidad, de ahí la necesidad de realizar un estudio detallado en cada caso específico.

Conclusiones

- El crecimiento óptimo de los callos de cebolla se obtuvo en los medios suplidos con picloram (0,1 mg/L) y 2iP (1 mg/L), y la regeneración de plantas fue posible en medios suplidos con 2,4-D (0,01 mg/L) y KIN (5 mg/L), aunque el número de brotes fue bajo en general.
- La presencia en los callos de células con un número de ploidía alterado, depende de los reguladores adicionados al medio de cultivo. Se comprobó que la presencia de 2,4-D induce los mayores por cientos de células con variación en el número de cromosomas, en comparación con los medios suplidos con picloram.
- Las plantas regeneradas a partir de los callos varían en cuanto a sus caracteres agromorfológicos, pero mantienen su condición diploide, lo cual indica que existe una presión de selección para la diferenciación de las células normales desde el punto de vista citogenético.
- Los patrones de isoenzimas peroxidases varían en los callos y las plantas regeneradas con respecto al cultivar original.
- Los resultados alcanzados indican que se puede utilizar esta técnica en investigaciones encaminadas a aumentar la variabilidad genética de este cultivar, necesaria en los programas de mejoramiento genético.

28. Fundora Z, Báez MR, Prats A, Soto JA. Repetibilidad en espacio, avance genético y correlaciones entre algunos caracteres de importancia económica en la cebolla. *Ciencias de la Agricultura* 1987; 32:47-51.

29. Vallés MP, Wang ZY, Montavon P, Potrykus I, Spangenberg G. Analysis of genetic stability of plant regenerated from suspension cultures and protoplasts of meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) *Plant Cell Rep* 1993; 12:101-6.

30. Vasil IK. Plant cell culture and somatic cell genetics of cereals and grasses. In: Vasil IK, Scowcroft WR, Frey KR, editors. *Plant improvement and somatic cell genetics*. New York: Academic Press; 1982. p.78-134.

31. Jordan MC, Larter EN. Somaclonal variation in triticale (*Triticosecale* Wittmack) cv. Carman. *Canadian J Genetics and Cytology* 1985;27(2):151-7.

32. Lassner MW, Orton TJ. Detection of somatic variation. In: Tanksley SD, Orton TJ, editors. *Isoenzymes in plant genetics and breeding*. Part A. Amsterdam: Elsevier; 1983. p.207-17.

33. Sabir A, Newbury HJ, Todd G, Catty J, Ford-Lloyd BV. Determination of genetic stability using isoenzymes and RFLPs in beet plant regenerated *in vitro*. *Theor Appl Genet* 1992;84:113-7.

34. Medina MI. Expression of a highly basic peroxidase gene in NaCl-adapted tomato cell suspensions. *FEBS Lett* 1997; 407(3):357-60.

35. De-Villiers RP, Van-der-Mescht A, Jausevan-Vuuren R. Determination of somaclonal variation in plants regenerated from four tomato cultivars. *J Southern African Society Hortic Sci* 1996;6(2):86-9.

36. Henry RJ. Molecular and biochemical characterization of somaclonal variation. In:

Jain SM, Brar DS, Ahloowalia BS, editors. *Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement*. *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture* 1998;32: 465-84.

37. Al-Zahim MA, Ford-Lloyd BV, Newbury HJ. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant Cell Rep* 1999;18:473-7.

38. Rus-Kortekaas W, Smulders MJM, Areus P, Vosman B. Direct comparison of levels of genetic variation in tomato detected by a GACA-containing microsatellite probe and by random amplified polymorphic DNA. *Genome* 1993;37:375-81.

39. Engelborghs I, Swennwn, Van Campenhout S. The potential of AFLP to detect genetic differences and somaclonal variants in *Musa* spp. *Infomusa* 1998; 7(2):3-6.