

Estandarización de un protocolo de regeneración de cebolla chalote (*Allium cepa* var. *aggregatum*) a partir de meristemas apicales

Joely Vega¹, Venancio Arahana¹ y María de Lourdes Torres^{1*}

¹Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales. Calle Diego de Robles y Vía Interoceánica, Campus Cumbayá, Edif. Newton. Casilla Postal 17-1200-841, Quito, Ecuador

*Autor principal/Corresponding author, correo electrónico: ltorres@usfq.edu.ec

Editado por/Edited by: Cesar Zambrano, Ph.D.

Recibido/Received: 2015/03/05. Aceptado/Accepted: 2015/03/24.

Publicado en línea/Published online: 2015/05/22. Impreso/Printed: 2015/06/01.

Standardization of an apical bud in vitro culture protocol for shallot onion (*Allium cepa* var. *aggregatum*) regeneration

Abstract

Shallots (*Allium cepa* var. *aggregatum*) are a type of onion which form several bulbs from a single basal disc. They are characterized by a high total solids content which improves their gastronomic and nutraceutical properties. Shallots (*Allium cepa* var. *aggregatum*) are a culinary staple with high commercial value in European, North American and South American markets. Their commercial production via vegetative propagation, however, is time-consuming and strongly affected by viral diseases. The aim of this study was to establish an *in vitro* apical meristem culture protocol for the regeneration of shallot plants. The efficiency of different regeneration and bulb-formation media were evaluated in this investigation. The best results for plant regeneration (68 % efficiency) were obtained with MS + 30g.L⁻¹ sucrose + 1.5g.L⁻¹ benomyl + 1.1µM NAA + 8.9µM BAP and for bulb formation (77 % efficiency) with MS + 10µM ancymidol and 50g.L⁻¹ sucrose. Moreover, 50 % of all plants regenerated from apical meristems were effectively acclimatized. The protocol developed and standardized in this investigation can be used to increase the efficiency of shallot bulb-seed production for commercial applications.

Keywords. *Allium cepa* var. *aggregatum*, apical bud, in vitro culture.

Resumen

La cebolla chalote (*Allium cepa* var. *aggregatum*) forma varios bulbos a partir de un solo disco basal y tiene mayor contenido de sólidos totales que aumentan su valor gastronómico y nutracéutico. Es un producto altamente valorado en el mercado europeo, estadounidense y sudamericano. En el Ecuador no se la registra como una variedad diferente a la cebolla roja. Sin embargo, la cebolla chalote es apetecida y utilizada dentro del sector gastronómico y aumenta el interés de su producción. El objetivo de este estudio fue estandarizar un protocolo de regeneración in vitro de plantas de chalote a partir de meristemas apicales. Se aisló meristemas apicales a partir de bulbos de chalote, se probó varios medios para la regeneración de plantas y la formación de bulbos. El porcentaje de regeneración de plantas más alto (68 %) se obtuvo con el medio: MS + 30g.L⁻¹ sacarosa, 1.5g.L⁻¹ benomyl + 1.1µM NAA + 8.9µM BAP, y de embulbamiento (77 %) con el medio: MS + 10µM ancymidol + 50g.L⁻¹ sacarosa. Finalmente, el 50 % de plantas regeneradas a partir de meristemas fueron aclimatadas eficientemente. El protocolo establecido en esta investigación puede ser utilizado para mejorar la producción de bulbo-semilla y así promover el cultivo de cebolla chalote en el país.

Palabras Clave. *Allium cepa* var. *aggregatum*, meristema apical, cultivo in vitro.

Introducción

Allium cepa var. *aggregatum* se caracteriza porque forma grupos de bulbos unidos por un mismo disco basal, mientras que la cebolla común (*Allium cepa* L.) solo forma un bulbo principal. Es originaria del centro y sudeste

de Asia, y actualmente está distribuida en todo el mundo [1]. Posee un mayor contenido de sólidos (16-33 %) que la cebolla común (7-15 %), entre los que se mencionan ácidos grasos, azúcares y compuestos sulfurados [2, 3]. Esto aumenta su valor gastronómico en la cocina gourmet ya que le confiere un olor y sabor mucho

más astringente y una consistencia más dura [1, 4]. De esta manera la cebolla chalote es un producto altamente valorado en el mercado europeo, estadounidense y sudamericano [3, 5]. Adicionalmente, la cebolla chalote tiene propiedades nutraceuticas relevantes asociados con su alto contenido de sólidos, pues se ha encontrado que los extractos de cebolla chalote tienen actividad antimicrobiana, principalmente contra bacterias Gram-positivas [2, 6]. Se ha reportado también que la ingestión de estos extractos de manera prolongada previene la formación de glóbulos rojos anormales en conejos con hipercolesterolemia [7].

La cebolla chalote se propaga principalmente de forma vegetativa, debido a que no produce flores ni semillas en países que no son de cuatro estaciones [2]. Las ventajas de esto son una producción uniforme y la preservación de su sabor y propiedades nutraceuticas. Las desventajas son: mayor tiempo para la obtención del material vegetal para el inicio del cultivo, necesidad de espacios grandes para el almacenamiento y acumulación de virus en el tejido vegetal que será usado como semilla [8].

Uno de los problemas que afectan el cultivo de especies del género *Allium* son las infecciones virales. Estas pueden ser devastadoras al punto de reducir la producción hasta el 80 % [9]. En el caso de la cebolla, específicamente el virus del enanismo amarillo (OYDV) reduce la producción entre 17 % y 60 %. Esto resulta en pérdidas económicas grandes para los productores. Además, la persistencia de enfermedades virales en el cultivo se incrementa por la falta de ciclos de reproducción sexual [10]. Los métodos disponibles para la erradicación de virus se basan en técnicas biotecnológicas como el cultivo in vitro de meristemas, con lo cual se obtienen bulbos libres de virus que sirven como semilla para el inicio del nuevo cultivo [11].

Se ha reportado para varias especies del género *Allium*, que el cultivo de meristemas se basa en el aislamiento de un domo apical (células no diferenciadas), de menos de 1 mm de longitud en condiciones de cultivo controladas [12]. El meristema aislado se desarrolla y se elonga como si fuera parte de la planta original debido a los reguladores de crecimiento que se encuentran en el medio de cultivo. Como reguladores de crecimiento para promover el crecimiento del meristema se utilizan usualmente bajas concentraciones de auxinas con altos niveles de citoquininas [13–19].

Una ventaja de esta técnica de cultivo in vitro es la estabilidad genética de la nueva planta, ya que los brotes se regeneran directamente a partir del meristema sin necesidad de pasar por una etapa de callo. Además se obtiene un alto porcentaje de propagación [20]. Por lo tanto, el cultivo de meristemas es un método utilizado para la conservación de germoplasma y micropropagación de plantas [21, 22].

Asimismo, el cultivo de meristemas es el método más conocido y estandarizado para erradicación de virus debido a que las células meristemáticas no presentan vas-

cularización. Es decir, el tejido meristemático no permite el paso del virus a su interior ya que no existe unión directa de las células meristemáticas con otros tejidos a través de plasmodesmos, xilema ó floema. Entonces, una planta regenerada a partir de este tipo de tejido será en principio libre de virus [22].

Con estos antecedentes, el objetivo de este proyecto fue estandarizar un protocolo para obtener plantas a partir de meristemas apicales de cebolla chalote. Esta metodología podrá ser utilizada posteriormente junto con otros tratamientos para obtener plantas libres de virus. De esta forma, se espera mejorar la producción de bulbo-semilla, contribuir a mejorar la producción de la cebolla chalote en el país y promover un mercado nuevo para esta variedad de cebolla.

Materiales y métodos

Material vegetal

Los bulbos de cebolla chalote utilizados en esta investigación se obtuvieron del programa de selección de esta especie, que se desarrolla en la Granja Experimental de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ). En este programa se utilizaron bulbos provenientes de las provincias de Carchi y Chimborazo, que se sembraron en tierra. Cada bulbo dio origen a lo que se denominó una familia (grupo de bulbos de un mismo origen). El ciclo de cultivo de la cebolla chalote en campo fue de 120-135 días hasta la cosecha.

En este estudio se realizaron 3 ensayos. El ensayo 1 destinado a determinar el tiempo ideal del tratamiento de frío para la ruptura de dormancia y la concentración hormonal óptima para regenerar plántulas de chalote a partir de meristemas apicales. Los ensayos 2 y 3 destinados a determinar el medio más eficiente para promover la formación de bulbo de cebolla chalote. La familia 11SO4 (Carchi) se utilizó en el ensayo 1 y la familia 10S07-3 (Chimborazo) en los ensayos 2 y 3. Se cosecharon las cebollas en los meses de enero, junio y diciembre 2013 para los ensayos 1, 2 y 3 respectivamente.

Introducción de discos basales de cebolla chalote a condiciones de cultivo in vitro

Los bulbos cosechados fueron expuestos a un secado inicial de 4 semanas en estanterías de madera bajo condiciones ambientales (temperatura máxima de 25°C y mínima de 8°C). Después de este proceso, los bulbos fueron sometidos a un tratamiento de frío. En el ensayo 1, se mantuvieron 50 bulbos por dos semanas y 50 bulbos por 4 semanas a 4°C. En los ensayos 2 y 3 se utilizaron 150 y 100 bulbos respectivamente, los cuales permanecieron a 4°C durante 4 semanas.

Luego de transcurrido el tratamiento en frío, independientemente del tiempo, se lavó los bulbos con agua corriente por 10 minutos, se retiró restos de tierra y se descartó los catáfilos secos. Se cortó los bulbos en forma transversal a un tercio de su longitud, se eliminó la parte

Código	Medio Basal	Sacarosa	Hormonas	Referencias
<i>Medio de Inducción y Regeneración</i>				
R1	MS* + benomyl 1,5 g. L ⁻¹	30 g.L ⁻¹	5 uM NAA+ 5 uM BAP	[23]
R2	MS + benomyl 1,5 g. L ⁻¹	30 g.L ⁻¹	1,1 uM NAA + 8,9 uM BAP	[14, 15]
<i>Medio de Crecimiento</i>				
C1	MS	30 g.L ⁻¹		[23]
<i>Medio de Embulbamiento y enraizamiento</i>				
E0	MS + carbón activado 5 g. L ⁻¹	60 g.L ⁻¹		[23]
E1	MS + carbón activado 5 g. L ⁻¹	50 g.L ⁻¹		[23]**
E2	MS + carbón activado 5 g. L ⁻¹	70 g.L ⁻¹		[23]**
E3	MS + carbón activado 5 g. L ⁻¹	90 g.L ⁻¹		[23]**
E4	MS+300 mg.L ⁻¹ NaPO ₄ +10uM ancymidol	30 g.L ⁻¹		[14]
E5	MS+300 mg.L ⁻¹ NaPO ₄ +10uM ancymidol	50 g.L ⁻¹		[14]**

*MS: Murashige & Skoog [24]

** Medio modificado en relación a cita original

Tabla 1: Medios de cultivo usados para el cultivo in vitro de cebolla chalote a partir de meristemas apicales.

apical y se conservó la parte basal. Dentro de la cámara de flujo laminar (LABCONCO Purifier Clean Bench), se sumergió los discos basales en etanol al 70 % por 10 min, luego en hipoclorito de sodio NaClO al 4,5 % con tres gotas de Tween 20 durante 30 min. Posteriormente, se lavó los discos basales con agua destilada estéril, y se retiró los catáfilos externos hasta obtener un explante de 1,5 cm de diámetro y 1 cm de altura.

Para inducir el crecimiento de hojas a partir de discos basales, se cultivó cuatro discos basales por frasco de vidrio con 50 mL del medio de cultivo R1 o R2 (Tabla 1, Figura 1). En total, se sembró 50 discos basales en cada medio de inducción en el primer ensayo, 75 en el segundo ensayo y 100 en el tercer ensayo. Se los incubó en el cuarto de cultivo a 25±1°C y un fotoperiodo de 16 horas luz.

Aislamiento y cultivo de meristemas apicales de cebolla chalote

Luego de una semana de cultivo de los discos basales en los medios R1 y R2, se procedió a extraer el meristema apical de cada disco basal usando el microscopio de disección. Se eliminaron uno a uno los catáfilos externos hasta alcanzar el tejido meristemático. Se extrajeron domos apicales de alrededor de 2mm x 2mm. A partir de estos domos se promovió la regeneración de plantas. Cada domo se cultivó en un tubo de ensayo con 20mL de los medios de cultivo R1 o R2 en los ensayos 1 y 2, y en R2 en el ensayo 3 (Tabla 1). Se los incubó en el cuarto de cultivo por cuatro semanas a 25±1°C y un fotoperiodo de 16 horas luz, para la formación de plántulas (Figura 1).

Embulbamiento de las plantas de cebolla chalote obtenidas de meristemas apicales

Las plántulas formadas a partir de los meristemas apicales fueron transferidas al medio de crecimiento C1 por cuatro semanas más (Tabla 1). Luego, las plántulas del primer ensayo se cultivaron en medio de embulbamiento E0 (Tabla 1) a 25±1°C y un fotoperiodo de 16 horas luz [23]. En el segundo ensayo se probaron los medios

de cultivo E1, E2 y E3 que contienen 3 concentraciones diferentes de sacarosa: 50, 70 y 90 g.L⁻¹ respectivamente (Tabla 1). En el tercer ensayo se utilizó los medios E4 y E5 con 10 uM de ancymidol y 2 concentraciones diferentes de sacarosa 30 y 50 g.L⁻¹ (Tabla 1) [14]. Luego de 12 a 15 semanas del cultivo a 25±1°C y un fotoperiodo de 16 horas luz, las plantas con raíces y bulbo de alrededor de 1cm de diámetro se aclimataron (Figura 1).

Aclimatación de plantas de cebolla chalote obtenidas de meristemas apicales

Para la aclimatación se colocó plantas de cebollas chalote de un tamaño mayor a 10 cm y con raíces en macetas de barro de 285 cc con tierra de la Granja de la USFQ previamente esterilizada (15min, 121°C, 15PSI). Las macetas se colocaron dentro de un frasco de vidrio. Los frascos se taparon con plástico transparente sujetado con una liga y se mantuvieron en el cuarto de cultivo a 25±1°C y un fotoperiodo de 16 horas luz. Se realizaron 2 huecos diarios en el plástico por 4 días. Luego de este tiempo, se retiró el plástico dejando abierto totalmente el frasco y se las regó con agua destilada estéril tres veces por semana. Después de 4 semanas, las plantas se pasaron a macetas plásticas de 2100 cc con tierra y se colocaron en el invernadero de la USFQ (Figura 1).

Análisis estadístico

Para determinar la eficiencia de los medios R1 y R2 en la regeneración y crecimiento de las plántulas de cebolla chalote a partir de meristemas apicales, se midió las variables: porcentaje de regeneración y altura de las plantas a las 4 semanas de cultivo. Para determinar la significancia estadística de estas dos variables se realizó la prueba t-student para muestras independientes y chi-cuadrado de Pearson respectivamente. Además, para determinar si existe una diferencia estadísticamente significativa entre los medios E4 y E5 en el porcentaje de embulbamiento de las plantas de chalote, se realizó el análisis de chi-cuadrado de Pearson y la prueba exacta de Fisher. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa Minitab [25].

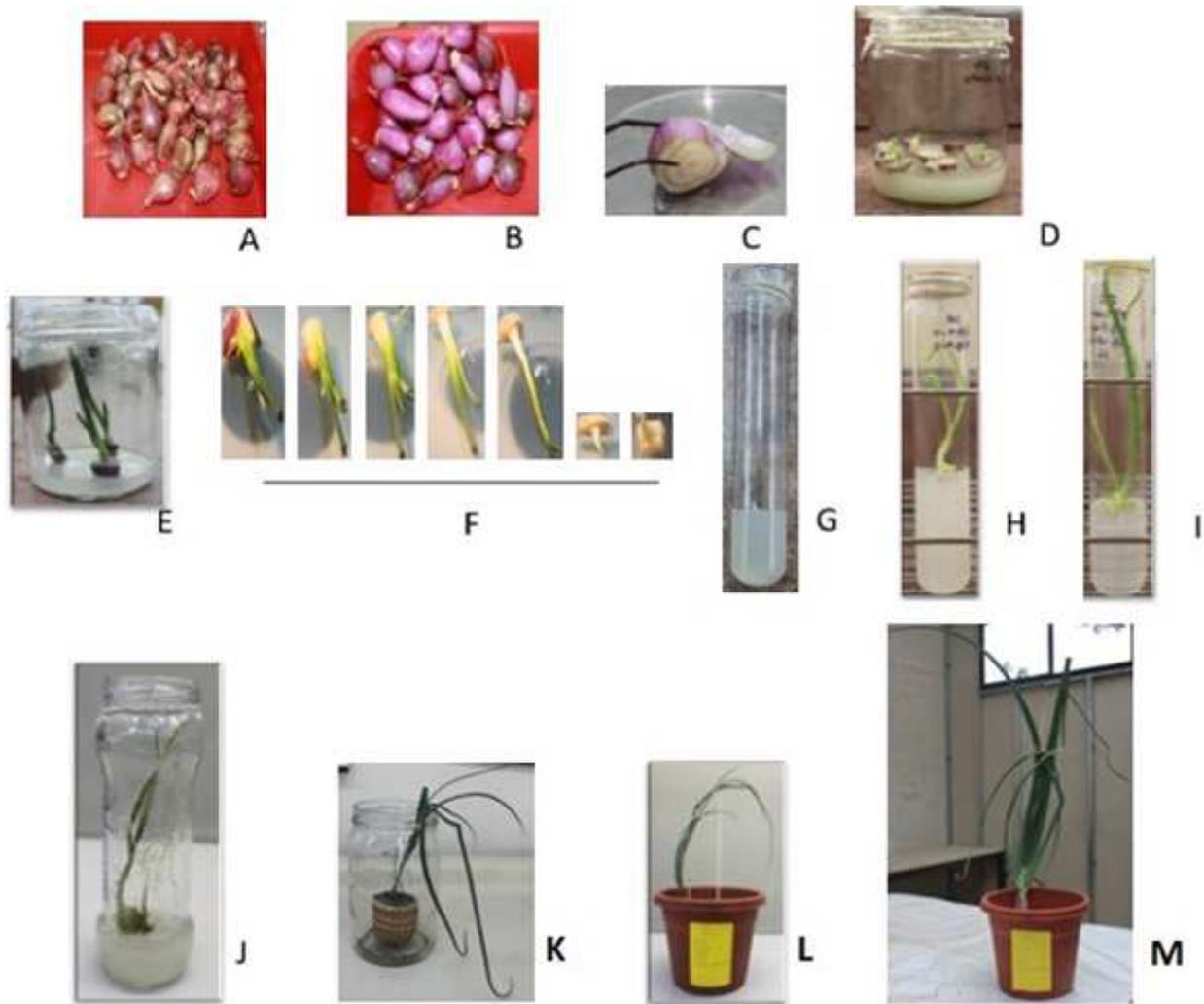


Figura 1: Esquema del proceso de regeneración de plantas de cebolla chalote a partir de cultivo de meristemas apicales. A. Bulbos de cebolla chalote. B. Bulbos lavados sin hojas externas secas. C. Bulbo luego del proceso de desinfección. D. Discos basales sembrados en medio de inducción. E. Discos basales en medio de inducción después de 4 semanas de cultivo. F. Eliminación sistemática de los catófilos más externos hasta dejar el disco basal acompañado del meristema apical rodeado de dos catófilos. G. Meristema apical en medio de inducción. H. Plántula regenerada después de cuatro semanas. I. Plántula en medio de crecimiento después de cuatro semanas. J. Planta en medio de embulbamiento después de doce semanas. K. Planta en maceta de barro luego de 4 semanas de aclimatación. L. Planta en maceta plástica luego de 8 semanas. M. Planta aclimatada luego de 15 semanas en el invernadero. Condiciones del cultivo *in vitro*: $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y fotoperiodo de 16 horas luz.

Resultados

Cultivo *in vitro* de meristemas apicales de cebolla chalote

Se observó un 100 % de brotación de hojas a partir de discos basales en los ensayos 1, 2 y 3. En el ensayo 1, después del aislamiento de meristemas apicales, se obtuvo un porcentaje mayor de regeneración de plántulas a partir de meristemas que provenían del tratamiento de 4 semanas a 4°C en comparación con el tratamiento de 2 semanas a 4°C (Tabla 2). Por lo tanto, para los dos ensayos posteriores se indujo ruptura de dormancia con tratamiento de frío a 4°C durante 4 semanas.

En cuanto al uso de diferentes concentraciones de hormonas en los medios de cultivo de regeneración, en el ensayo 1, el mayor porcentaje de regeneración de plántulas a partir de meristemas apicales (80 %), se obtuvo

en el medio R2, en comparación con un 40 % de regeneración en el medio R1 (Tabla 2).

En el ensayo 2 luego de 4 semanas en medio de regeneración se observó un 57 % de regeneración en R1 y 61 % en R2. Las plántulas cultivadas en R1 presentaron un promedio de crecimiento de 3.36 ± 1.34 cm y las plántulas sembradas en R2 un promedio de 4.7 ± 1.5 cm. No se observó diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento de plántulas a partir de meristemas apicales ($t=1.989$, $p = 0.107$) ni del porcentaje de regeneración (Chi-cuadrado de Pearson = 0.243, $p = 0.622$) entre los medios de cultivo R1 y R2. A pesar de este resultado, las plántulas en R2 presentaron una mejor apariencia, siendo más grandes y robustas. Por lo tanto, en el ensayo 3 se usó el medio de regeneración R2 que tenía la combinación hormonal: $1.1 \mu\text{M NAA} + 8.9 \mu\text{M BAP}$. Con esta combinación se obtuvo un 68 %



Figura 2: Crecimiento de plantas de cebolla chalote en dos medios de cultivo con concentraciones diferentes de sacarosa. Medio embudamiento E5 (MS + 10 μ M ancymidol + 50g.L⁻¹ sacarosa) y E4 (MS + 10 μ M ancymidol + 30g.L⁻¹ sacarosa). Plantas del ensayo 3 luego de 8 semanas de cultivo, a 25 \pm 1 $^{\circ}$ C y un fotoperiodo de 16 horas luz.

de regeneración de plántulas después de 4 semanas de cultivo.

Embulbamiento de plantas de cebolla chalote

En el ensayo 1 se cultivó 43 plantas en medio E0 por 12 semanas pero ninguna de ellas formó bulbos. Al contrario, el 83 % de plantas presentaron señales de envejecimiento y el 16 % restante no presentaron raíces, aunque sí hojas verdes delgadas. Estas plantas no pudieron ser aclimatadas.

En el ensayo 2, luego de doce semanas, en el medio E1 se observó crecimiento en el 68,2 % de plantas, pero solo el 26 % de plantas formaron bulbo y el 33 % desarrollaron raíces. Mientras que en el medio E3 se observó crecimiento en el 34,7 % de plantas, 13 % de plantas formaron bulbo y 8,7 % desarrollaron raíces. Se aclimataron 8 plantas que provenían del medio E1, 3 del medio E2 y 4 del medio E3, de las cuales 4, 1 y 2 plantas respectivamente se aclimataron exitosamente (Tabla 2).

Debido a que el porcentaje de embudamiento obtenido con los medios E0, E1, E2 y E3 no fue alto, en el ensayo 3 se probaron los medios E4 y E5 (Tabla 1). En el medio E4, después de quince semanas de cultivo, sólo el 35 % de plantas crecieron, ninguna presentó bulbo ni raíces y alcanzaron una altura promedio de 4 \pm 0,74 cm. En el medio E5, 65 % de las plantas crecieron, 77 % desarrollaron bulbo, todas presentaron raíces gruesas y bien formadas y alcanzaron una altura promedio de 12,5 \pm 2,5 cm (Figura 2). Se encontró diferencias significativas entre el medio E4 y E5 (Chi-cuadrado de Pearson = 11,691, p = 0,001; Prueba exacta de Fisher, p = 0,0013) para la eficiencia del embudamiento de las plantas de cebolla chalote.

Finalmente, 22 plantas con bulbo y raíces fueron aclimatadas. 50 % de las plantas se aclimataron eficientemente, 32 % de plantas presentaron contaminación por hongos y 18 % se secaron luego de cuatro semanas de haber sido transferidas a tierra en el invernadero (Tabla 2).

Discusión

Para regenerar plantas a partir de meristemas apicales de cebollas chalote, se compararon dos factores importantes: tiempo de exposición al frío para la ruptura de dormancia y la concentración de hormonas en los medios utilizados en cada fase del proceso de regeneración.

En condiciones naturales, la brotación de los bulbos de cebolla chalote ocurre luego de un cierto tiempo después de la cosecha dependiendo del genotipo y las condiciones de almacenamiento, debido a que éstos tienen un periodo de dormancia [26]. Estudios de Benkeblia y colaboradores [27] demostraron que los compuestos fenólicos interfieren indirectamente con el proceso de brotación de bulbos de cebolla y que una baja temperatura (0 $^{\circ}$ C) activa una señal para reducir fenoles, con lo cual se promueve la brotación de bulbos. Adicionalmente, en bulbos de cebolla que no han sido sometidos a un tratamiento de frío no se produce brotación, mientras que a partir de dos semanas de tratamiento de frío la concentración de fenoles disminuye [27]. Por lo tanto, en este estudio se realizó la comparación de dos tiempos de ruptura de dormancia mediante la exposición de los bulbos de cebolla chalote a 4 $^{\circ}$ C durante 2 y 4 semanas. Se observó que 4 semanas de frío promueve un mayor porcentaje de regeneración de plantas a partir de meristemas apicales que con dos semanas de frío, lo que se podría asociar con una mayor reducción de producción de fenoles en los bulbos [27].

En la fase de regeneración de plántulas a partir de meristemas se compararon dos combinaciones de hormonas en los medios R1 y R2. No se observó diferencias significativas en el porcentaje de regeneración de plantas entre los dos medios. Sin embargo, con el medio R2, que tiene una cantidad menor de auxina y mayor de citoquinina, se obtuvo un porcentaje de regeneración mayor (Tabla 2) y las plántulas presentaron un rango de tamaño superior respecto de las plántulas en medio R1 que tienen concentraciones equivalentes de auxinas y citoquininas. En la literatura se reporta que las citoquininas desempeñan un papel fundamental en la estimulación de la regeneración y crecimiento de plantas y por lo tanto se las utiliza en concentraciones mayores que las auxinas, en una relación cercana a 10:1 [15]. Esto es consistente con resultados reportados para la mayoría de especies del género *Allium* [14–19].

En el ensayo 1, un porcentaje mayor a 75 % de plantas sembradas en medio de embudamiento E0 presentaron desecación de hojas, deterioro del sistema radicular y crecimiento lento; es decir, presentaron las características que se atribuyen a la senescencia temprana, seguramente por las condiciones de cultivo a las que estuvieron expuestas las plantas. Generalmente, la senescencia se da en el final del ciclo de vida de plantas cuando alcanzan su madurez debido a variaciones en la expresión génica que detienen el crecimiento e inicia el proceso de muerte celular programada. Sin embargo, la senescencia

Ensayo	Brotación discos basales	Regeneración de plántulas	Crecimiento	Embulbamiento y enraizamiento			Aclimatación			
1	Medio	R1	R1	C	E0			E0		
	2 SF	100 %*	40 %	60 %	17 %			NA		
	4 SF	100 %	76 %	74 %	7 %			NA		
	Medio	R2	R2	C	E0			E0		
	2 SF	100 %	48 %	67 %	25 %			NA		
	4 SF	100 %	80 %	75 %	20 %			NA		
2	Medio	R1	R1	C	E1	E2	E3	E1	E2	E3
	4 SF	100 %	57 %	74 %	70 %	45 %	36 %	33 %	0 %	0 %
	Medio	R2	R2	C	E1	E2	E3	E1	E2	E3
	4 SF	100 %	61 %	78 %	66 %	33 %	33 %	60 %	50 %	66 %
3	Medio	R2	R2	E4	E5			E4		E5
	4 SF	100 %	68 %	35 %	65 %			0 %		50 %

*Los porcentajes presentados en esta tabla representan: #plantas vivas/# plantas sembradas

SF: Semanas de frío

NA: No aclimatado

Tabla 2: Resultados obtenidos en cada fase del cultivo de meristemas de cebolla chalote en los tres ensayos realizados.

temprana acelera todos estos procesos en estadios previos a la madurez [17, 28]. La senescencia temprana se da a través de una cascada de señales en la que interviene la acción de etileno, ácido jasmónico, ácido salicílico y ácido abscísico. Esta señalización se activa por varios factores endógenos de la planta como desbalance en los reguladores de crecimiento y factores exógenos de la planta como radiación solar alta o baja o temperaturas extremas [29]. Finalmente, este proceso genera problemas en el proceso de aclimatación de la planta lo que determina que su crecimiento no sea viable.

En el ensayo 2 con el medio E1, que contiene 50 g.L⁻¹ de sacarosa, se logró un 68 % de crecimiento de las plantas y un 26 % de embulbamiento que es inferior a los reportados en la literatura [14, 17, 23, 30]. Mientras que en los medios E2 y E3 que contienen 70 y 90 g.L⁻¹ de sacarosa respectivamente, menos del 35 % de las plantas sobrevivieron y de las que sobrevivieron el 13 % presentaron bulbo (Tabla 2). Este efecto se puede relacionar a que las plantas pueden absorber y asimilar una cantidad limitada de sacarosa [31–33]. El excedente puede causar estrés osmótico, proceso que se da cuando existe una concentración de solutos en el exterior de la célula mayor al que se encuentra en su interior. Entonces, el agua sale de la célula, aumenta la concentración de solutos en el citoplasma y se genera un efecto plasmolítico [34].

Finalmente, en el ensayo 3 con el medio E5 (MS + 50 g.L⁻¹ de sacarosa + 10uM ancymidol) se observó que el 65 % de plantas crecieron, 77 % desarrollaron bulbo y todas presentaron raíces. Le Guen y colaboradores [14] reportaron que el ancymidol combinado con altas concentraciones de sacarosa estimula el ensanchamiento de la base de las hojas y promueve la rizogénesis como se observó en este ensayo. Este efecto se puede dar porque el ancymidol al ser una antigiberelina heterocíclica bloquea la conversión de ent-kaureno a ácido ent-kaurenoico e inhibe la biosíntesis de GA3 [35].

Por lo tanto, la concentración de carbohidratos en el medio de cultivo y la acción de una antigiberelina son esenciales para el embulbamiento de la cebolla chalote. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, la concentración óptima de sacarosa en el medio de cultivo para el embulbamiento de cebolla chalote es de 50 g.L⁻¹ y es necesaria la adición de 10 uM de ancymidol.

La aclimatación de las plantas del ensayo 2 fue efectiva para el 50 % de plantas provenientes del medio E1, 33 % de plantas del medio E2 y 50 % plantas del medio E3. En el ensayo 3, se aclimató eficientemente el 50 % de plantas que provenían del medio E5. Después de dos meses en tierra, las plantas presentaron hojas verdes más grandes, disco basal más grueso y ensanchamiento del bulbo. La pérdida de plantas en este proceso se debió en un 60 % a la contaminación por hongos y en un 40 % a la desecación. Este resultado se pudo deber a un sistema radicular deficiente y un porcentaje de humedad relativa alto en los primeros días del proceso de aclimatación.

Conclusiones

Como resultado de esta investigación se determinó que 4 semanas de frío es más efectivo que 2 semanas de frío para ruptura de dormancia de bulbos de cebolla chalote. Se observó que el medio R2 (MS + benomyl 1,5 g.L⁻¹ + 30 g.L⁻¹ sacarosa + 1,1 uM NAA + 8,9 uM BAP) fue el más eficiente para la regeneración de plantas a partir de meristemas apicales y que utilizando el medio E5 (MS + 10uM ancymidol + 50 g.L⁻¹ sacarosa + 300 mg.L⁻¹ NaPO₄) se obtuvo el mayor porcentaje de embulbamiento y plantas con raíces que pudieron ser aclimatadas. Los resultados obtenidos de este estudio son la base para realizar estudios futuros en los cuales se pueden aplicar protocolos de mejoramiento de bulbo-semilla y/o limpieza de virus para contribuir a mejorar la producción de la cebolla chalote en el país.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad San Francisco de Quito por el financiamiento para esta investigación a través del programa Small Grants. A Carlos Ruales, por propocionar el material vegetal y por su apoyo a lo largo de la ejecución de este proyecto, a Darío Ramírez por su guía al inicio de esta investigación, a Andrés Torres por sus correcciones y comentarios en la escritura de este manuscrito y a los asistentes del Laboratorio de Biotecnología Vegetal por todo su apoyo.

Referencias Bibliográficas

- [1] Fritsch, R.; Friesen, N. 2002. "Evolution, Domestication and Taxonomy". *Allium Crop Science: Recent Advances*. H.D. Rabinowitch, L. Currah (Eds.) CABI: Osnabrück: 5–30.
- [2] Currah, L.; Proctor, F. 1990. "The genetic base and the cultivars grown in the tropics". *Onions in Tropical Regions. Bulletin 35. Natural Resources Institute, Chatham Maritime: Kent*: 31–52.
- [3] Messiaen, C.; Lot, H.; Delecolle, B. 1994. "Thirty years of France experience in the production of disease-free garlic and shallot mother bulbs". *Acta Horticulturae*, 358:275–279.
- [4] Grubben, G. 1994. "Constraints for shalot, garlic and welsh onion in Indonesia: a case study on the evolution of allium crops in the equatorial tropics". *Acta Horticulturae*, 358:333–339.
- [5] Loebenstein, G.; Lecoq, H. 2012. "Viruses of the Genus Allium in the Mediterranean Region", en: "Advances in virus research". *Thessaloniki*: 164–166.
- [6] Dankert, J.; Tromp, T.; de Vires, H.; Klasen, H. 1979. "Antimicrobial activity of crude juices of Allium ascalonicum, Allium cepa and Allium sativum". *Zentralblatt fur Bakteriologie, Paraxitenkunde, Infection skrankheiten and Hygiene*, 245:229–239.
- [7] Tappayuthpijarn, P.; Dejatiwongse, Q.; Hincheraan, T.; Suriyant, P. 1989. "Effect of Allium ascalonicum on erythrocyte shape in induced hypercholesterolemia rabbits". *Journal of the Medical Association of Thailand*, 72:448–451.
- [8] Rabinowitch, H.; Kamenetsky, R. 2002. "Shallot (Allium cepa, aggregatum group)", en: "Allium Crop Science: Recent Advances". H.D. Rabinowitch, L. Currah (Eds.) CABI: Osnabrück: 409–430.
- [9] Diekmann, M. 1997. "Allium spp.". *FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm*, (18).
- [10] Fletcher, P.; Fletcher, J.; Lewthwaite, S. 1998. "In vitro elimination of onion yellow dwarf and shallot latent viruses in shallots (Allium cepa var. ascalonicum L.)". *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 26:23–26.
- [11] Walkey, D. 2002. "Virus diseases", en: "Onions and Allied Crops". H. D. Rabinowitch, J. Brewster (eds): Florida: 191–212.
- [12] Grout, B. 1990. "Meristem-tip culture". *Methods Molecular Biology*.
- [13] Abdelnour, A.; Bermudez, L.; Alvarenga, S.; Rivera, C. 2006. "Cultivo de meristemas, termo y quimioterapia en chayote (Sechium, edule Jacq. Sw.) para la erradicación del virus del mosaico del chayote (ChMV)". *Manejo de Plagas y Agroecología*, 77:17–23.
- [14] Le Guen-Le, F.; Hourmant, A.; Esnault, F.; Chauvin, J. 2002. "In vitro Bulb Development in Shallot Effects of Anti-gibberellins, Sucrose and Light". *Annals of Botany*, 89:419–425.
- [15] Kahane, R.; Rancillac, M.; Teysseidier de la Serve, B. 1991. "Long-term multiplication of onion (Allium cepa L.) by cyclic shoot regeneration in vitro". *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 28:281–288.
- [16] Xu, Z.; Um, Y.; Kim, C.; Lu, G.; Guo, D.; Liu, H. 2008. "Effect of plant growth regulators, temperature and sucrose on shoot proliferation from the stem disc of chinese jiaotou (Allium chinense) and in vitro bulblet formation". *Acta Physiol Plant*, 30:521–528.
- [17] Seabrook, J. 1993. "In vitro propagation and bulb formation of garlic". *Canadian Journal of Plant Science*, : 155–158.
- [18] Zheng, S.; Henken, B.; Sofiari, E.; Keizer, P.; Jacobsen, E.; Kik, C.; Krens, F. 1999. "Effect of cytokinins and lines on plant regeneration from long-term callus and suspension cultures of Allium cepa L.". *Euphytica*, 108: 83–90.
- [19] Shakuntala, N.; Gunnar, F.; Tage, E. 1977. "Effects of 6-(3-methyl-2-buten-1-ylamino)-purine and α -naphthaleneacetic acid on root formation and cytology of root tips and callus in tissue cultures of Allium cepa var. proliferum". *Institute of Physiological Botany, Hereditas*, 85:57–62.
- [20] Roca, W.; Beltrán, J. 1984. "Fundamento para la aplicación del cultivo de meristemas en la conservación de germoplasma". *El cultivo de meristemas para la conservación de germoplasma de yuca in vitro, Cali*: 8–10.
- [21] Shibolet, Y.; Gal-On, A.; Koch, M.; Rabinowitch, H.; Salomon, R. 2001. "Molecular characterisation of Onion yellow dwarf virus (OYDV) infecting garlic (Allium sativum L.) in Israel". *Annals of Applied Biology*, 138: 187–195.
- [22] Salomon, R. 1996. "Virus Diseases in Garlic and the propagation of virus free plants", en: "Allium Crop Science: Recent Advances". H.D. Rabinowitch, L. Currah (Eds.) CABI: Osnabrück: 312–324.
- [23] Ramírez, D. 2013. "Regeneración de plántulas de chalote (Allium cepa var. aggregatum) libres de los virus Latente del Chalote y del Enanismo Amarillo de la cebolla por medio de cultivo de meristema apical y quimioterapia". *Universidad San Francisco de Quito, Tesis de Ingeniería: Quito*.

- [24] Murashige, T.; Skoog, F. 1962. "A revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures". *Physiologia Plantarum*, 15(3):473–497.
- [25] Minitab. 2014. *Minitab Quality Companion. Statistical Software*.
- [26] Bufler, G. 2009. "Exogenous ethylene inhibits sprout growth in onion bulbs". *Annals of Botany*, 103:23–28.
- [27] Benkeblia, N. 2003. "Low Temperature and Breaking of Dormancy Effects on Respiration Rate, Sugars, Phenolics and Peroxidase Activity Changes in Inner Buds of Onion *Allium cepa* L". *Soil and plant science*, 53:16–20.
- [28] Edwards, K.; Humphry, M.; Sanchez-Tamburrino, J. 2012. "Advances in Plant Senescence". *Senescence, T. Nagata (Eds.). Cambridge*: 117–136.
- [29] Jordán, M.; Casaretto, J. 2006. "Hormonas y reguladores del crecimiento: etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, poliaminas, ácido salicílico y ácido jasmónico". *Fisiología Vegetal*: 1–28.
- [30] Mohamed-Yasseen, Y.; Barringer, S.; Splittstoesser, W. 1995. "In vitro bulb production from *Allium* spp.". *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 31:51–52.
- [31] Rademacher, W. 2000. "Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways". *Plant Molecular Biology*, 51:501–531.
- [32] McCallum, J.; Clarke, A.; Pither, M.; Shaw, M.; Butler, R.; Brash, D.; Scheffer, J.; Sims, I.; Brash, D.; Heusden, S.; Shigyo, M.; M., H. 2006. "Genetic mapping of a major gene affecting onion bulb fructan content". *Theory Apply Genetics*, 112:958–967.
- [33] Havey, J.; Galmarini, C. R.; Gökçe, A.; Henson, C. 2004. "QTL affecting soluble carbohydrate concentrations in stored onion bulbs and their association with flavor and health-enhancing attributes". *Genome*, 47:463–468.
- [34] Pérez, J.; Harper, G.; Ramírez, R. 2009. "Teoría celular". *Antología de Biología Celular: México*: 90–93.
- [35] Benkeblia, N.; Ueno, K.; Onodera, S.; Shiomi, N. 2005. "Variation of fructooligosaccharides and their metabolizing enzymes in onion bulb during long-term storage". *Journal of Food Science*, 70:208–213.