



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

Propagación in vitro de dos cultivares
de Allium cepa L.

Tesis Profesional

Que para obtener el título de

B I O L O G O

P r e s e n t a

LAURA MIRANDA TAPIA

México, D. F.

1985



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Pág.
RESUMEN	6
I. INTRODUCCION	7
II. ANTECEDENTES	
II.1. <u>Allium cepa</u> L.	
II.1.1. Descripción Botánica de <u>Allium cepa</u> L.	9
II.1.2. Clasificación	10
II.1.3. Origen y Distribución	10
II.1.4. Valores nutritivos y propiedades Medicinales	11
II.1.5. Importancia Económica en México	11
II.1.6. Métodos de propagación	13
II.1.7. Enfermedades y Plagas	14
II.2. Cultivo de Tejidos Vegetales	
II.2.1. Generalidades	17
II.2.2. Medio de Cultivo	19
II.2.3. Reguladores del Crecimiento	20
II.2.4. Condiciones de Incubación	22
II.2.5. Importancia en Fitomejoramiento	24
II.2.6. Cultivo de Tejidos Vegetales en <u>Allium</u> y especies cercanas a <u>Allium cepa</u> L.	25

	Pág.
III. OBJETIVOS	28
IV. MATERIALES Y METODOS	
IV.1. Material Biológico	29
IV.2. Esterilización y Disección de los explantes	29
IV.3. Siembra	33
IV.4. Preparación del medio de cultivo	34
IV.5. Condiciones de incubación	40
V. RESULTADOS Y DISCUSION	41
VI. CONCLUSIONES	58
APENDICE I	59
APENDICE II	60
BIBLIOGRAFIA	61

ABREVIATURAS

AIA	= ácido 3-indolacético
AIB	= ácido indolbutírico
ANA	= ácido α -naftalenacético
BAP	= 6-bencilaminopurina
B.C.N.	= Baja California Norte
2, 4-D	= 2, 4-diclorofenoxiacético.
2iP	= 6-(γ,γ -dimetilalilamino)-purina
D.G.E.A.	= Dirección General de Estadística Agrícola
K	= 6-furfurilaminopurina (cinetina)
M. N.	= Moneda Nacional
MS	= medio Murashige y Skoog (1962)
S.A.R.H.	= Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos
Z	= 6-(4-hidroxi-3-metil-but-2-enilamino)-purina (zeatina)

RESUMEN

En este trabajo se realizaron pruebas para analizar la respuesta morfogénica in vitro de Allium cepa L. de los cultivares Cojumatlán y Suprema.

Los explantes utilizados fueron ápices con placa basal y escamas con placa basal.

Se probaron diferentes condiciones de temperatura e intensidad luminosa.

El medio utilizado fue el MS modificado por Hussey (1978), al cual se le adicionó BAP + ANA y 2iP + ANA para la inducción de brotes axilares y adventicios.

Se logró la propagación somática directa, es decir, no hubo formación de callo a partir de los dos tipos de explante.

Las escamas respondieron mejor en los dos cultivares cuando se agregó al medio BAP (4.0 mg/l) y ANA (0.5 mg/l) con 27 ± 2 °C de temperatura obteniéndose 3.2 plántulas en promedio por explante, mientras que para el cultivar Suprema cuando se adicionó al medio BAP (5.0 mg/l) y ANA (0.7 mg/l) a 20 ± 2 °C se obtuvieron 2.6 plántulas en promedio.

Se utilizaron mitades de los bulbos regenerados in vitro los cuales dieron un promedio de 2.6 plántulas por explante además de que la frecuencia en la formación de la brotación múltiple fue alta para todas las combinaciones probadas.

Las condiciones que dieron los mejores resultados de enraizamiento fueron luz roja con AIB.

I. INTRODUCCION

Las verduras son importantes para el ser humano por ser las que proporcionan el complemento vitamínico para el buen aprovechamiento de los alimentos.

La cebolla (Allium cepa L.) es una hortaliza de amplia distribución en el mundo y su utilización como un producto alimenticio es muy extenso (Hoffman, 1933).

En toda la República Mexicana existen cultivos de cebolla, esto se debe a la gran demanda que tiene esta especie por formar parte de la dieta normal del mexicano, además de que también las condiciones climáticas del país favorecen su cultivo.

En algunas regiones del país es notoria la marcada preferencia por determinado tipo de cebolla, por lo que las variedades que se recomienda sembrar encada una de ellas, están estrechamente ligadas a la adaptación de este cultivo al medio y a la preferencia del consumidor (Montes, 1972).

La producción de semillas de las plantas hortícolas en nuestro país ha recibido relativamente poca atención comparada con otros cultivos básicos de la dieta nacional (Cabrera, 1982), por esta razón es conveniente usar técnicas que faciliten la propagación clonal y masiva de plantas con genotipos seleccionados (Murashige, 1978).

Los métodos de propagación masiva por la técnica de cultivo de tejidos vegetales (CTV) de algunas especies de hortalizas ya se han establecido (Murashige, 1978), entre estas se encuentra la cebolla, pero es necesario lograr la transferencia de estas tecnologías, ya que la respuesta de los cultivos in vitro en ocasiones es altamente específica aún en cultivos de la misma especie, por lo que dichas técnicas se deben adecuar al cultivo de las variedades que se adapten a las diferentes condiciones ecológicas del país y que aquí se consiguen (Rubluo, et al., 1982).

Las técnicas de CTV se han vuelto de gran importancia ya que se pueden aplicar a un amplio intervalo de problemas fundamentales como aspectos básicos de morfogénesis, bioquímica y fisiología (Street, 1977), así como también aspectos aplicados para la producción de fármacos y otros productos naturales, recuperación de clones libres de enfermedades, preservación de germoplasma valioso y multiplicación clonal rápida de variedades seleccionadas.

El cultivar Cojumatlán es producido principalmente para consumo interno del país y el cultivar Suprema es producido como producto de exportación.

Por todo lo anterior se realizaron diferentes pruebas con reguladores de crecimiento y diferentes condiciones de temperatura e intensidad luminosa para la propagación masiva in vitro de Allium cepa L.

II. ANTECEDENTES

II.1. Allium cepa L.

II.1.1. DESCRIPCION BOTANICA DE Allium cepa L.

El género Allium es muy extenso, consta aproximadamente de 500 especies distribuidas en el hemisferio norte, muchas nativas de norteamérica; con un fuerte olor característico, algunas se cultivan para aprovecharse como hortalizas o como ornamentos. Son plantas escamosas, la mayoría con hojas sub-basales o radicales únicamente, las cuales al igual que el escapo son fistulosas o huecas, con bulbos turicados, flores pequeñas, pocas o numerosas en umbelas terminales que emergen de caliptras escariosas que son de 1 a 3; foliosas, blancas, verdosas, amarillas, rosas o púrpuras, con 6 segmentos blancos libres o connados en la base; 6 estambres unidos a la base del perianto; pistilo con un ovario súpero de tres cavidades; estilo delgado y entero o con un estigma trifido; el fruto es una pequeña cápsula loculada (Bailey, 1977).

La especie Allium cepa L., tiene hábitat variable, aroma muy fuerte, potencialmente bianual, generalmente no forma grupos; bulbos grandes, escapo de 2 a 4 pies, hueco y engrosado, más alto que las hojas; en el primer año las hojas radicales y basales son huecas, gruesas abajo de la mitad del glauco; flores numerosas lilas o casi blancas en grandes umbelas sostenidas por dos o tres brácteas reflejas, los pedicelos de una pulgada o menos de longitud, segmentos del perianto angostos, lanceolados agudos; 3 estambres más internos o expandidos en la base y lobulados o dentados sobre ambos lados (Bailey, 1977).

II.1.2. CLASIFICACION

Anteriormente se clasificaba a Allium cepa L. en la familia Amaryllideaceae (Hutchinson, 1959), pero Cronquist (1981) la clasifica en la familia Liliaceae. Su clasificación es la siguiente:

Reino	Vegetal
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsidae
Subclase	Liliidae
Orden	Liliales
Familia	Liliaceae
Género	<u>Allium</u>
Especie	<u>Allium cepa</u> L.

II.1.3. ORIGEN Y DISTRIBUCION

Se cree que la cebolla es originaria de Asia (Albertos, et al., 1971; Montes, 1972; Font Quer, 1980), y aunque no se sabe exactamente la región de donde procede, la mayoría de los naturalistas citan como probable origen, la parte comprendida entre Palestina y la India, en cuyos montes del Himalaya se dice haber encontrado cebollas silvestres (Albertos, et al., 1971).

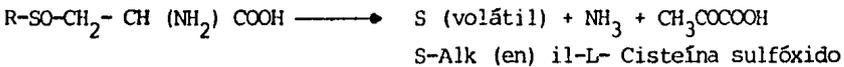
La antigüedad del cultivo se remonta a más de 4,000 años habiéndose utilizado en los tiempos más remotos; documentos históricos demuestran que los Caldeos usaban la cebolla para su magia miles de años antes de Cristo. Al parecer las primeras dinastías egipcias, la importaron ya que sus habitantes desde entonces tenían gran estimación por esta hortaliza (Albertos, et al., 1971; Font Quer, 1980).

II.1.4. VALORES NUTRITIVOS Y PROPIEDADES MEDICINALES

Entre los valores nutritivos de la cebolla se encuentran diversos azúcares importantes que son los que realza sus cualidades alimenticias. También contienen a las vitaminas C, B₁, B₂, y D (Font Quer, 1980), materiales albuminoides, ácido fosfórico, ácido acético y fosfato de calcio (Martínez, 1939).

La cebolla tiene compuestos volátiles los cuales le da el olor fuerte y distintivo.

En el bulbo intacto normalmente no están presentes los compuestos volátiles, pero aparecen rápidamente durante la preparación o masticación. Al parecer el precursor del sabor y su enzima respectiva están compartimentarizados dentro del tejido de la planta y entran en contacto solo cuando el sistema celular pierde su integridad. Los precursores del sabor de Allium se han identificado como derivados sulfóxidos de aminoácidos, los cuales sufren la siguiente reacción general (Eskin, 1979):



Entre las propiedades medicinales que se le atribuyen a la cebolla se encuentran las siguientes: sirve como diurético, abre el apetito, favorece la digestión, es hipotensor, es útil en el tratamiento de jaqueca, reumatismo, tuberculosis, fiebres, tifoidea, gripe, difteria o escarlatina, cáncer en riñón e intestino (Font Quer, 1980; Martínez, 1939).

II.1.5. IMPORTANCIA ECONOMICA EN MEXICO

En México se consume gran cantidad de cebolla ya que la comida mexicana se caracteriza por usar este condimento al igual

que otros vegetales como el ajo, pimienta, cominos, etc.

En cada región existen preferencias por algún cultivar en especial por lo que el consumo de cada variedad está en estrecha relación con la cultura y con las condiciones que determinada región ofrece para la producción del cultivar.

La cebolla fresca es la que se consume en mayor cantidad aunque también gran parte de la producción nacional se destina a la industria de alimentos enlatados.

Según datos proporcionados por el Departamento de Estadística Agropecuaria Nacional de la D.G.E.A. de la S.A.R.H., en el año de 1982, la superficie total que se cosechó en México fue de 25,258 hectáreas (ha) con una proporción total de 421,240 toneladas teniendo esto un valor anual de \$ 5,303,667,311.00 M.N. Los estados con mayor producción de cebolla en 1982 fueron:

ESTADO	SUP. COSECHADA (ha)	TONELADAS	VALOR (\$)
México	1,036	14,751	426,570,000.00
Zacatecas	1,329	29,257	85,538,339.00
B.C.N.	1,491	21,454	219,207,286.00
Jalisco	1,735	39,366	293,339,560.00
Chihuahua	2,008	73,589	73,589,000.00
Puebla	2,252	30,457	496,570,041.00
Tamaulipas	2,446	46,500	1,728,031,659.00
Michoacán	2,654	45,477	402,774,576.00
Morelos	2,695	49,380	991,286,000.00
Guanajuato	5,878	49,273	381,940,045.00

La cebolla no sólo es importante por su gran demanda comercial en la República Mexicana, sino porque también es un producto que se exporta y tiene un amplio mercado internacional. México la exporta principalmente a los Estados Unidos. La información proporcionada por el Departamento de Relaciones Internacionales del Sector Agropecuario de la D.G.E.A. de S.A.R.H., nos muestran los siguientes datos de exportación:

AÑO	VOLUMEN (Kg)	VALOR(\$)
1982	62,760,771	553,113,083.00
1983	62,732,458	882,064,771.00
1984 (Ene.-Abr.)	70,201,087	1,314,690,222.00

Como se puede notar, estas cifras demuestran la importancia económica que representa el cultivo de la cebolla para el país como producto de exportación.

II.1.6. METODOS DE PROPAGACION

Actualmente se utilizan 3 métodos de propagación agrícola para el cultivo de cebolla. A continuación se resume cada uno de ellos:

1. Siembra directa: Se siembra la semilla en el terreno donde se desarrollará definitivamente, se emplean de 4.5 a 6 Kg por hectárea; este método es recomendable cuando se tiene la seguridad de que la planta pequeña no sufrirá por competencia con malezas, falta de agua o por plagas del suelo.

2. Plantación de bulbillos en el lugar definitivo: Este método es usado cuando se practica la siembra de temporal y consiste en dejar la planta expuesta al sol por varios días hasta que

el "rabo" se seque y quede unicamente el bulbillo que posteriormente será plantado en el lugar definitivo, así la planta tendrá mayores posibilidades de sobrevivir a una sequía y reanudar su crecimiento durante la temporada de lluvias.

3. Transplante: Este método es el más importante por ser el más usado y el que ha dado mejores resultados. Consiste en sembrar las semillas en almácigos, dejar que las plantas alcancen una altura de 20 cm aproximadamente, esto es al mes y medio o dos meses después de la siembra y posteriormente se transplantan al lugar definitivo, para este método se requieren de 1.5 a 2 Kg por hectárea (Montes, 1972).

II.1.7. ENFERMEDADES Y PLAGAS

Los daños producidos por insectos, en general, son poco importantes, debido al efecto insectífugo de las esencias propias de la cebolla y rara vez ocasionan daños de consideración (Albertos, et al., 1971). A continuación se enlistan algunas plagas que atacan a la cebolla (S.A.R.H., 1974).

Micromyzus formosanus Takah., o pulgón, chupa los jugos de las hojas de la cebolla.

Copitarsia turbata (H.S.) conocida como palomilla, capturada en estado adulto sobre cebolla sin indicarse sus hábitos.

Peridroma saucia (Hüner) conocido también como qusano trozador, cuando se encuentra en estado larvario corta a las plantitas arriba de la base del tallo.

Frankliniella occidentalis (Pergande) o trips, se han colectado en cebolla sin indicarse sus daños en ella.

Thrips tabaci (Lindeman) o trips de la cebolla, chupa los jugos de las hojas.

Plesiothrips sp. también conocidos como trips, fueron colectados en cebolla sin indicarse sus daños.

Los hongos y bacterias sí causan graves daños en las cebollas produciendo diversas enfermedades, a continuación se enlistan algunas:

Mancha púrpura. Producida por el hongo Alternaria porri (B!!). Se ha localizado en los estados de San Luis Potosí y Tamaulipas. En éste último estado la cebolla ha tenido serios problemas con este hongo sobre todo porque la mayor parte de la producción se destina para la exportación a los Estados Unidos (Montes, 1972). La enfermedad comienza con la formación de pequeñas lesiones hundidas y en cuyo centro aparecen manchas oscuras que se agrandan tomando un color púrpura separadas del tejido sano por una zona clara; estas manchas llegan a rodear hojas y tallos.

Otra enfermedad es la pudrición suave ocasionada por la bacteria Erwinia carotovora (Jones) Holland, se ha localizado esta enfermedad en el Estado de México. Penetra en las raíces y bulbos a través de heridas ocasionadas por insectos o por la labranza. Frecuentemente los bulbos y raíces afectados despiden mal olor y sus tejidos internos se encuentran desintegrados.

La enfermedad conocida como cenici!!a vellosa o mildiu velloso es producida por el hongo Peronospora destructor. Se presenta con regular frecuencia sobre todo en la región central de la República Mexicana y a veces ocasiona pérdidas considerables. Entre sus principales síntomas se observan cuerpos globosos de color rojizo o púrpura cerca de las puntas de las hojas viejas; las hojas se amarillan y se rompen, el tallo también puede ser infectado. La enfermedad es grave en épocas lluviosas, el hongo sobrevive en los bulbos o en el suelo para ocasionar las primeras infecciones para el año siguiente. Se ha encontrado en los estados de México y Jalisco.

Pudrición del bulbo. Esta enfermedad es causada por el hongo Fusarium oxysporum f. cepae (Hans.) produce la pudrición del

bulbo y raíces. Es común observar amarillamiento de la parte aérea y la marchitez de la misma. Las raíces generalmente presentan un color rosado y poco a poco se van pudriendo. Frecuentemente la pudrición está asociada a la presencia de gusanos del suelo, Se localizó en Morelos y Tlaxcala.

Pudrición bacteriana. Producida por Pseudomonas allicola Starr y Burkh. Ocasiona la pudrición suave del bulbo sobre todo durante el almacenamiento. Se reportó en el Estado de México.

La enfermedad del carbón. Es producida por el hongo Urocystis cepulae Frost, es de las más destructivas y ataca a la planta cuando está brotando. En las hojas y en las escamas de los bulbos aparecen manchas bien definidas que posteriormente se convierten en pústulas, las cuales al romperse dejan al descubierto manchas negras y polvorientas llenas de esporas. Esta enfermedad se reportó en el Estado de Morelos (García, 1979 a; García, 1979 b).

II.2. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

II.2.1. GENERALIDADES

El término de cultivo de tejidos vegetales es definido por Street (1977) como cualquier tejido multicelular puesto en un medio sólido o puesto en un sustrato y nutrido por una solución líquida en el cual las células están en continuidad protoplásmica. Los principios del cultivo de tejidos están contenidos en la teoría celular expresada en 1838-1839 por Schleiden y Schwann la cual postula que cada célula viva de un organismo multicelular es capaz de ser autónoma y presentar totipotencialidad, ésto es, que una célula totipotente es aquella capaz de desarrollarse en un organismo completo (Dodds y Roberts, 1982; Gautheret, 1982). Esta teoría fue obvia para el caso del huevo y de la espóra, pero no para las células somáticas. Pasó mucho tiempo para poder demostrar esta teoría. El primer paso fué logrado por Haberlandt en 1902 quien hizo el primer intento para

cultivar células aisladas in vitro en un medio nutritivo pero no logró la división celular, en parte esto se debió a que uso un medio nutritivo relativamente simple ya que utilizó células altamente diferenciadas (Gautheret, 1982; Dodds y Roberts, 1982).

El primer éxito en el cultivo de órganos fué logrado por White en 1934 con la demostración del crecimiento potencialmente ilimitado de puntas de raíces aisladas. Los dos problemas principales a los que se enfrentó White son: a) la elección del material vegetal correcto y b) la formulación de un medio nutritivo satisfactorio. Por ese mismo tiempo Went descubrió que la auxina ácido 3-indolacético es la que promueve el crecimiento celular que ya había sido descubierta por el químico Salkowski en 1885 pero se desconocía su función (Gautheret, 1982).

En 1939 Gautheret en París, Nobecourt en Grenoble y White en Princeton lograron el primer CTV en el sentido amplio del término, al obtener callo a partir de tejido del cambium de tabaco y zanahoria gracias al uso de AIA (Caldas, et al., 1975; Dodds y Roberts, 1982; Gautheret, 1982).

Para las dicotiledóneas, las auxinas indujeron la proliferación de cambium y el desarrollo de tejidos capaces de diferenciarse dentro de éste, pero las monocotiledóneas crecieron pobremente con auxinas. Un nuevo progreso se obtuvo con el agua de coco, la cual Overbeck en 1941 utilizó con éxito para el desarrollo de embriones híbridos de Datura, cuando se probó con tejidos de zanahoria se observó una gran proliferación (Dodds y Roberts, 1982; Gautheret, 1982).

En 1950 Morel aclaró que no era una auxina el factor que promueve el crecimiento. En 1955 la cinetina fué el primer miembro aislado de las citocininas, más tarde se reconoció a otra citocinina, la zeatina, la cual se encuentra en el agua de coco. Finalmente se usó la combinación de auxinas y citocininas y ésto aunado a una nueva solución de sales propuesta por Murashige y Skoog en

1962, permitieron el crecimiento de la mayoría de los tejidos (Dodds y Roberts, 1982). Las investigaciones sobre organogénesis fueron las bases para lo que ahora es llamado genéricamente micropropagación.

En 1964, Morel aplicó esta técnica a la propagación clonal de orquídeas logrando mediante el cultivo de meristemas la erradicación de los virus.

Durante los años de 1960 se demostró que las anteras de angiospermas tenían el potencial para producir un vasto número de embriones haploides. Otro desarrollo de esta misma década fue la técnica del aislamiento de protoplastos (Dodds y Roberts, 1982; Gautheret, 1982).

Otras aplicaciones que recientemente se han realizado es el aislamiento de metabolitos secundarios a partir de cultivos in vitro (Gautheret, 1982).

II.2.2. MEDIO DE CULTIVO

La composición del medio de cultivo es un factor determinante así como lo son la edad y tipo de explante para lograr la regeneración o el crecimiento del cultivo. Los requerimientos nutritivos básicos para las células vegetales in vitro son muy similares a aquellos utilizados normalmente para las plantas (Murashige, 1974; Gamborg, et al., 1976; Dodds y Roberts, 1982). El medio Murashige-Skoog (MS) (1962) o Linsmaier y Skoog (LS) es usado muy ampliamente, en particular si el objetivo deseado es la regeneración de plantas (Gamborg, 1984).

El medio para casi todos los cultivos comprende cinco grupos de componentes: nutrientes inorgánicos, fuente de carbono, vitaminas, reguladores de crecimiento y suplementos orgánicos (Gamborg, et al., 1976; Gamborg, 1984).

Los nutrientes orgánicos consisten de sales minerales, los cuales suministran a los cultivos los requerimientos de macro y micronutrientes como son N, K, P, Mg, S, Ca, I, B, Mn, Zn, Mo, Cu, Co, y Fe.

Las células cultivadas utilizan sin excepción sacarosa y glucosa casi con el mismo efecto. La fructosa es menos eficiente. La sacarosa en el medio es rápidamente convertida a glucosa y fructosa, primero es utilizada la glucosa y posteriormente la fructosa. El myo-inositol es adicionado al medio como factor del crecimiento, las células vegetales en cultivo requieren tiamina (vitamina B₁).

También hay numerosos reportes sobre efectos benéficos alcanzados por la adición del ácido nicotínico, piridoxina (vitamina B₆), pantotenato, biotina y folato, que se usan en cantidades traza (Dodds y Roberts, 1982; Gamborg, 1984).

Aunque las células cultivadas normalmente son capaces de utilizar todos los aminoácidos, la adición de L-glutamina (2.0 a 8.0 μM) o mezcla de aminoácidos, frecuentemente es benéfico. El hidrolizado de caseína es comunmente utilizado con éxito y consiste de una mezcla indefinida de por lo menos 18 aminoácidos (Gamborg, et al., 1976; Dodds y Roberts, 1982).

Entre los suplementos orgánicos se encuentra la peptona, el extracto de levadura, el extracto de malta, el agua de coco, los jugos y pulpas de frutos, los cuales tienen una composición variable y desconocida, el uso de estos suplementos no es muy común hoy en día, pero no deben ignorarse cuando las mezclas químicas definidas no producen los resultados deseados (Thorpe, 1982; Dodds y Roberts, 1982; Gamborg, 1984).

II.2.3. REGULADORES DEL CRECIMIENTO

En 1957 Skoog y Miller (Dodds y Roberts, 1982) establecieron la teoría del balance hormonal según la cual el inicio de tallos y raíces en el cultivo de callos podía ser regulada por una relación particular de auxinas y citocininas; sin embargo no todas las especies responden igual a este balance hormonal por lo que se sugiere ensayar distintas combinaciones de los reguladores del crecimiento para determinar las mejores concentraciones y combinaciones hormonales que inducirán la respuesta de los tejidos en cultivo.

Los reguladores del crecimiento juegan un papel importante en el control de la división y diferenciación de las células vegetales.

Sin embargo falta mucho por entender de su acción a nivel molecular (Street, 1977).

Existen tres grupos principales de reguladores del crecimiento los cuales son importantes en el CTV y son las auxinas, las citocininas y las giberelinas, las dos primeras son las que más se necesitan para un buen éxito en micropropagación (Thorpe, 1982).

La propiedad común de las auxinas es inducir el alargamiento celular de los tallos, las principales auxinas que se utilizan son: AIA (ácido 3-indolacético), ANA (ácido α -naftalenacético) y 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacético).

El AIA es una auxina natural y las otras son sintéticas. El ácido 3-indolacético es afectado por factores que estimulan su degradación como la luz, los peróxidos y ciertas enzimas vegetales, un ejemplo es la AIA oxidasa (Salisbury y Ross, 1978).

Otros compuesto efectivos son el 2,4,5,-T (ácido 2,4,5-Triclorofenoxiacético). Las auxinas también estimulan la iniciación de la raíz. El AIB (ácido indolbutírico) es muy utilizado para el enraizamiento (Dodds y Roberts, 1982; Gamborg, 1984).

Las citocininas son derivadas de la adenina y tienen un papel importante en la división y en la diferenciación celular.

Las citocininas usadas más frecuentemente son: K (6-furfurilaminopurina), BA (6-bencilaminopurina), Z (zeatina), e IPA (isopenteniladenina) (Hall, 1976; Dodds y Roberts, 1982; Gamborg, 1984).

La zeatina es una citocinina natural identificada por Letham en 1964 en Nueva Zelanda y casi simultáneamente por Miller en Indiana, ambos la aislaron del endosperma del maíz (Salisbury y Ross, 1978).

Muchas purinas sustituidas y ureas, han reemplazado con éxito a las citocininas para inducir la organogénesis.

Las giberelinas son usadas generalmente para la regeneración de plantas después de que ha ocurrido la formación de primordios (Thorpe y Patel, 1984).

Las giberelinas y el ácido abscísico adicionados al medio han demostrado tener un papel importante en la formación de órganos; finalmente otros metabolitos tales como los ácidos fenólicos han demostrado aumentar la organogénesis en algunas especies (Thorpe y Patel, 1984).

II.2.4. CONDICIONES DE INCUBACION

Las condiciones bajo las cuales se mantienen los tejidos cultivados determinan su éxito ya que afectan su desarrollo (Arditti y Strauss, 1979). Hay muchos aspectos de las condiciones de la incubación que pueden influir en el desarrollo organizado, estos incluyen: 1) la forma física del medio, 2) el pH, 3) la humedad y la atmósfera, 4) la luz, 5) la temperatura.

1) La forma física del medio se refiere a si es líquido o sólido, interviene en el crecimiento y diferenciación del callo en la fase líquida, habiendo mayor proliferación de células del callo porque todas están en contacto con el medio de cultivo.

2) El pH para el medio líquido se ajusta generalmente a 5.0 y para el medio sólido a 5.8 (Thorpe y Pate, 1984), pero el intervalo que se calcula para la asimilación de nutrientes es de 5.0 a 6.5 (Thorpe, 1982). Dougal y Verma (1978) en (Thorpe, 1982) demostraron que la capacidad de utilización del NH_4 por cultivos celulares como única fuente de N, dependió de que el pH estuviera arriba de 5.0.

3) Humedad y atmósfera, virtualmente no hay estudiosos de los efectos de la variación de niveles de humedad en el desarrollo organizado. Parte de las razones es que la humedad relativa (HR) del medio ambiente está encerrado a 100%. Sin embargo Bouniols (1974) en (Thorpe, 1982) han demostrado claramente que la humedad

relativa que rodea a los cultivos influye en el patrón de desarrollo organizado.

4) La luz es el principal factor del medio ambiente del cultivo y se ha demostrado que tiene un efecto en el desarrollo organizado in vitro. La iluminación debe considerarse en términos de intensidad, calidad y período de iluminación (Arditti y Strauss, 1979).

Al respecto cabe mencionar que los requerimientos de luz durante el cultivo de tejidos son diferentes a los de las plantas autótrofas en su hábitat. En los tejidos en cultivo y aún en las plántulas in vitro, la fotosíntesis no es una actividad necesaria, excepto durante la etapa de adaptación de las condiciones ambientales debido a que los carbohidratos son suplementados al medio, no obstante la luz es necesaria para regular algunos procesos morfogénicos y se ha reportado su importancia para la formación de brotes, la iniciación de raíces y durante la embriogénesis somática.

Intensidad es la brillantez de la luz que incide en el tejido. Murashige (1974) establece para Asparagus, Gerbera, Saxifraga y algunas bromeliáceas una intensidad óptima de 1,000 lux para la fase I y II que consiste en el establecimiento aséptico del tejido en un medio de cultivo y la producción de órganos y de 3,000 a 10,000 lux para la fase III que incluye el enraizamiento, robustecimiento y conversión de plantas heterótrofas a autótrofas.

Cantidad: este término se refiere al fotoperíodo que no es más que la cantidad de horas-luz a las que está expuesto el explante. Se sabe que la planta en condiciones normales requiere un cierto tipo de fotoperíodo ya sea de día corto, largo o neutral, y de alguna manera, por mecanismos hasta ahora desconocidos, va a manifestar esta necesidad cuando se encuentre en condiciones in vitro. Aparentemente el factor que más influye en la planta es el total de energía radiante de una calidad específica. Gautheret describió un

fotoperíodo de 12 horas de luz como el óptimo para la iniciación de raíces y tallo en Nicotiana y Helianthus (Murashige, 1974).

Calidad es en sí el color de la luz y cada planta tiene sus requerimientos específicos al respecto. Se ha visto que dentro del espectro luminoso, la región del azul permite la formación de brotes aéreos y la del rojo forma raíces, se sabe también que estos dos colores son absorbidos, por la clorofila y si la fuente de iluminación tiene un alto porcentaje de estos colores es considerada de buena calidad (Murashige, 1974).

5) Temperatura; generalmente los cultivos se conservan a una temperatura constante entre 20 y 30 °C. Sin embargo la temperatura óptima para el crecimiento y diferenciación de una especie en particular debe de terminarse, pues diferentes especies tienen diferentes óptimos (Thorpe, 1982).

II.2.5. IMPORTANCIA EN FITOMEJORAMIENTO

Los factores que influyen en cualquier especie vegetal pueden dividirse en dos clases: a) variaciones debidas al medio ambiente y b) variaciones debidas a la herencia. Estas últimas se originan por recombinaciones de genes después de una hibridación, por mutación y por poliploidías, de esta manera por medio de estos procesos las especies vegetales han evolucionado en la naturaleza y han alcanzado su estado actual de desarrollo (Milton, 1974).

Cuando se seleccionan plantas por tener características deseadas se recurre a métodos tradicionales para conservarlas y producir las, sin embargo, este proceso es en muchos casos lento, con muy baja producción de individuos con esas características y es costoso, además, no se tiene la certeza de que las semillas producidas originen plantas con algunas de las características parentales.

Lo valioso de la propagación asexual es que se producen plantas de genotipos seleccionados con la seguridad de que las características deseadas de la planta son retenidas a través de su

clonación lo cual puede obtenerse por medio de la propagación in vitro (Murashige, 1974; Thorpe y Patel, 1984).

El CTV es un método de propagación que permite mayor rapidez de multiplicación vegetal. La clonación también puede aumentar el valor de la progenie y la producción de semillas de calidad (Murashige, 1978; Thorpe y Patel, 1984).

Otra ventaja de la técnica es que los patógenos son excluidos, dando como resultado el aumento en el vigor y cualidades de la planta.

También pueden presentarse en los cultivos in vitro plantas con características que difieren del cultivar. Generalmente las plantas aberrantes son inferiores en sus características pero ocasionalmente pueden tener mejores cualidades y éstas pueden ser aumentadas ventajosamente en un nuevo cultivar (Murashige, 1974; Murashige, 1978; Thorpe y Patel, 1984).

Los métodos in vitro pueden servir a los cultivadores de dos formas: primero, algunas técnicas pueden servir de ayuda para lograr los objetivos tradicionales de cultivo. Segundo, acercarse al desarrollo de genotipos que no pueden obtenerse por los métodos convencionales, aumentando así la variabilidad genética de la especie. Las técnicas de cultivo de embriones, óvulos y ovarios pueden usarse para ayudar al primer propósito mientras que las técnicas de protoplastos pueden ser útiles para el segundo. Los cultivos de células aisladas, anteras y microsporas se podrían aplicar a ambos (Murashige, 1978).

II.2.6. CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES EN Allium Y ESPECIES CERCANAS

A Allium cepa L.

En lo que se refiere al cultivo in vitro de monocotiledoneas los explantes que se utilizan con más frecuencia para la inducción de brotes adventicios son: las yemas auxiliares, las escamas, la base de la hoja, el tallo, las inflorescencias y partes de la flor

pedicelos, ovarios, pétalos, polen, etc. Las yemas axilares cultivadas en medio con citocininas, desarrollan ramificaciones incrementándose en subcultivos, esto se ha analizado en Gladiolus, Frassia e Iris (Hussey, 1982). El principal método de propagación en este grupo de plantas es la inducción de brotes adventicios directamente de los explantes sin recurrir a la formación de callos.

Fujieda et al. en 1977 indujo la formación de brotes adventicios a partir de ápices con placa basal de Allium fistulosum. Utilizó el medio MS suplementado con K (de 1.0 a 2.0 mg/l) y con ANA (1.0 mg/l) y a los cuarenta días obtuvo los brotes adventicios.

En Allium porrum (poro), también se han obtenido brotes a partir de explantes de la región basal, el medio de cultivo utilizado fue el BDS utilizado por Dunstan y Short, en 1977, se le agregó 2iP (6.0 a 8.0 mg/l) y ANA (de 1.0 a 2.0 mg/l) (Dunstan y Short, 1979 b).

None en 1981 regeneró plantas de Allium sativum (ajo) libres de virus a partir de meristemas apicales. Los mejores resultados los obtuvo con el medio MS más 1 ppm de ANA y posteriormente subcultivados con un medio sin hormonas.

Fridborg en 1971 logró la inducción de callo a partir de escamas internas de Allium cepa L. a las seis semanas usando el medio B5 y 2, 4-D (5 μ M), a los ocho meses logró el desarrollo de plantulas con el mismo medio de cultivo y 2iP (5 μ M).

Hussey (1978) también indujo la formación de brotes adventicios a partir de ápices con placa basal y escamas con placa basal de Allium cepa L. El medio de cultivo utilizado fue el MS modificado según el autor del trabajo. Los fitoreguladores que dieron mejores resultados fueron BAP (0.5 a 4.0 mg/l) y ANA (0.5 a 2.0 mg/l) Con el 2iP (0.5 a 4.0 mg/l) tuvo una respuesta parecida a la inducida por BAP.

También Dunstan y Short (1979 a) han desarrollado plan-

tulas a partir del capitulum de la cebolla puesto sobre medio sólido y han logrado la regeneración óptima con el medio B5 modificado por Gamborg, et al. en 1968, con altos niveles de fosfatos y nitrógeno, y con bajos niveles de 2, 4-D conteniendo 1.0 mg/l de BAP.

III. OBJETIVOS

Los objetivos planteados para el presente trabajo fueron intentar la transferencia de las tecnologías de propagación in vitro de Allium cepa L. logrado en otros países, adaptándolo a las necesidades y condiciones de México.

Para esto, se seleccionaron cultivares de cebolla de importancia económica tanto por su consumo nacional (cv. Cojumatlán) como por ser de exportación (cv. Suprema).

Dado que la respuesta de los cultivos in vitro es en ocasiones altamente específico ya que varía la respuesta aún en cultivares de la misma especie (Rubluo, et al. 1984), se trató de establecer las concentraciones de reguladores del crecimiento como las condiciones de incubación para una propagación clonal y masiva lo cual ofrece múltiple ventajas como ya se mencionó; también se hicieron pruebas con dos diferentes explantes para comparar la capacidad de regeneración de éstos.

IV. MATERIALES Y METODOS

IV. 1. MATERIAL BIOLÓGICO

Para la realización de este trabajo se utilizaron bulbos de cebolla, Allium cepa L., de los cultivares Cojumatlán y Suprema de una edad de cuatro meses y medio aproximadamente.

El cultivar Cojumatlán se consiguió en el mercado local de Xochimilco, D.F. y el cultivar Suprema se consiguió directamente en un campo de cultivo de cebolla en el ejido "Las Tinajas" en Cuautla, Morelos.

Los explantes utilizados fueron ápices con placa basal o platillo basal y escamas (hoja) con placa basal (tallo), (figs. 1 y 2).

IV. 2. ESTERILIZACIÓN Y DISECCIÓN DE LOS EXPLANTES

Los bulbos se lavaron con agua corriente, se quitaron las hojas y raíces y la catáfila más superficial. Una vez hecho esto, los bulbos limpios se llevaron a la campana de flujo laminar donde se sumergieron en etanol al 96 por ciento durante un minuto. A continuación el bulbo se dividió a la mitad, de forma transversal al eje de crecimiento sobre una caja de Petri estéril, se desechó la parte superior y la base se dividió en cuatro fragmentos como se indica en la figura 1.

Cuando se tuvieron los cuatro fragmentos de cada bulbo, se pasaron por una solución de etanol al 70 por ciento v/v y se dejaron un minuto, posteriormente los fragmentos se pasaron a un vaso de precipitado con una solución de hipoclorito de sodio al 33.3 por ciento v/v de cloralex comercial (2 por ciento de cloro activo) y se dejaron en agitación por diez minutos, después se metió el vaso de precipitado a la campana, y ahí se enjuagaron cuatro veces con agua destilada esterilizada, a continuación se procedió a hacer la disección de las escamas con la placa basal; con ayuda de un microscopio estereoscópico, unas pinzas, una aguja de disección y una navaja, se

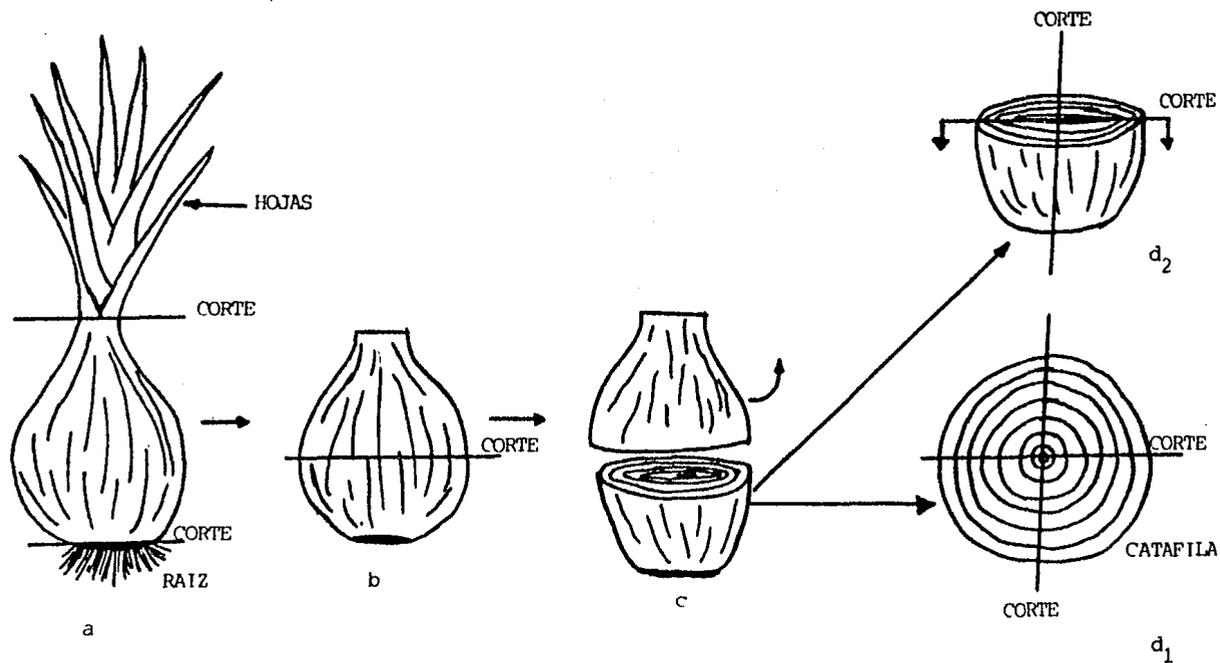


Fig. 1. Disección de los bulbos para la esterilización. a) se lavan los bulbos y se quitan las hojas y las raíces; b) el bulbo se divide a la mitad haciendo un corte transversal al eje de crecimiento; c) la parte superior se elimina y la inferior d_1 y d_2 se divide en 4 fragmentos (dos vistas).

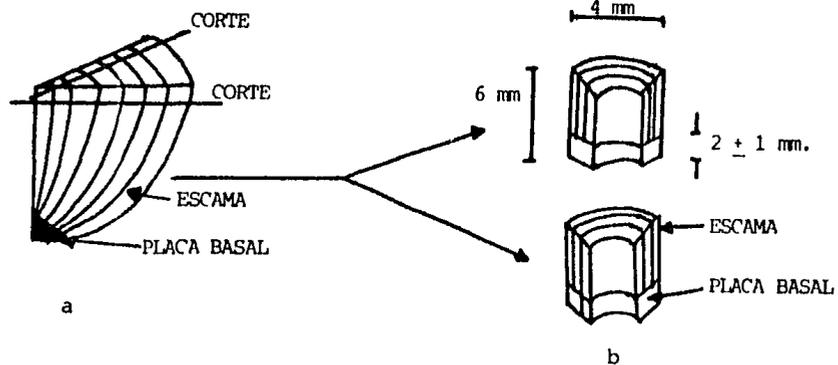


Fig. 2. Disección de los fragmentos de bulbo para obtener las escamas con placa basal. a) Se quita el tejido más superficial y dañado y b) se cortan fragmentos que contengan 3 es cas as con placa basal de las dimensiones que se señalan en el dibujo.

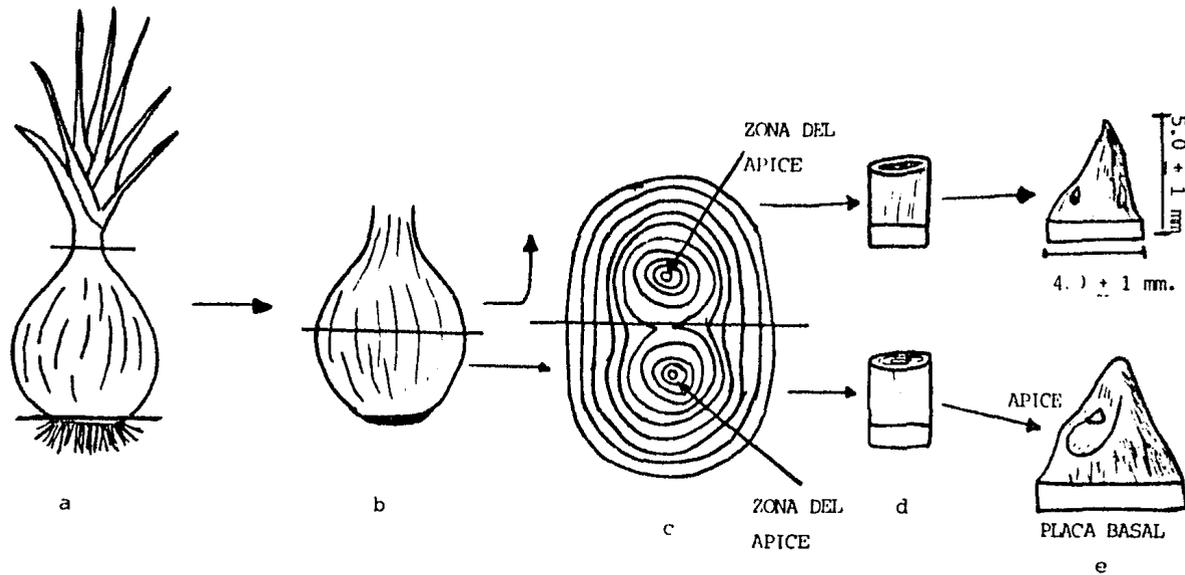


Fig. 3. Disección de los ápices con placa basal. a) Se lava la cebolla y se le quitan hojas y raíces; b) el bulbo se divide a la mitad; c) si se observan dos zonas de ápices como se muestra en este dibujo se divide el bulbo para separarlas; d) se quitan las escamas circundantes hasta tener fragmentos como se señalan en el dibujo y ; e) una vez esterilizados éstos, se quitan las escamas dañadas hasta obtener los ápices.

cortaron los bordes de cada fragmento y posteriormente se cortaron segmentos de tres escamas con placa basal, el explante tuvo una longitud de 6 ± 1 mm y 4 ± 1 mm de ancho, la placa basal midió 2 ± 1 mm de grueso como se indica en la figura 2 y finalmente se pusieron tres explantes en cada frasco.

El procedimiento de esterilización que se siguió para los explantes de escama con placa basal se utilizó también para los explantes de ápices con placa basal, sólo que en este caso los fragmentos que se seccionaron del bulbo fueron aquellas zonas en las que a simple vista se observó que contenían el ápice como se describe en la figura 3.

Para la disección se quitaron las hojas que rodeaban al ápice, el tamaño del explante fué de 5 ± 1 mm de alto por 4 ± 1 mm de ancho. Se colocaron en tubos de ensayo con el medio de cultivo.

IV. 3. SIEMBRA

Dado que el medio de cultivo contiene nutrientes que podrían favorecer el desarrollo de microorganismos como bacterias y hongos que además de tomar los nutrientes del medio destruirían al tejido y podrían arrojar al medio sustancias tóxicas, lo que afectaría al desarrollo del explante (Dodds y Roberts, 1982), la siembra se realizó en un área aséptica en una campana de flujo laminar (VECO). Antes de desinfectarla se puso a funcionar y se introdujo todo el material que se requirió para la siembra, ésto incluyó frascos con medio de cultivo, microscopio estereoscópico, instrumental (navaja de acero inoxidable, pinzas, espátulas, agujas de disección, bisturí, etc.), el instrumental se colocó en un recipiente con alcohol etílico industrial al 70 por ciento, las cajas de Petri esterilizadas y los bulbos.

Una vez que el material estuvo dentro de la campana de flujo laminar, se desinfectó superficialmente con alcohol etílico in

dustrial al 70 por ciento, para asegurar la asepsia se trabajó cerca de mecheros Bunsen, las pinzas y espátulas se flamearon en cada ocasión que se utilizaban.

ya que está desinfectado el material se procedió a la esterilización del área de sembrado con alcohol etílico industrial al 96 por ciento y se dejó secar el alcohol. Una vez seco se encendió el mechero y se dejó así por 10 minutos antes de empezarla esterilización de los explantes.

Para aislar las escamas con placa basal se utilizó un microscopio estereoscópico y un ocular micrométrico para medir el explante, pero posteriormente ya no fue necesario y se efectuó rutinariamente a simple vista.

Se sembraron tres explantes de escama con placa basal en cada frasco; en el caso de los apices con placa basal se colocaron dos en cada tubo de ensayo.

IV.4. PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo utilizado fue el MS modificado por Hussey (1978). En el apéndice I se describe la constitución del medio.

Para la preparación del medio de cultivo se usaron soluciones concentradas de sus diferentes componentes, macronutrientes, solución de Fe con EDTA, inositol, vitaminas y glicina, preparadas para 10 y 20 litros como se muestra en el apéndice II. Se conservaron en refrigeración a 6 °C hasta su utilización. Se tomaron alícuotas de la solución concentrada según cálculos para la cantidad de medio que se iba a preparar y se mezclaron en una parrilla de agitación, posteriormente se agregó la sacarosa y después los fitorreguladores. A continuación se aforó la solución y se ajustó el pH entre 5.7 y 5.8 con NaOH (0.1 y 0.5 N) y HCl (0.1 y 0.5 N).

Esta solución se calentó en una parrilla de agitación, y una vez que estuvo tibia se le agregó el agar y se dejó calentar

hasta que se disolvió. Se vaciaron 20 ml del medio de cultivo en un frasco de boca ancha de 100 ml de capacidad y en los tubos de ensayo de 25 x 150 mm se agregaron 16 ml, posteriormente se taparon con papel aluminio y se sellaron con una liga de hule. El medio se esterilizó en una autoclave a 20 lb/pulg² de presión y 126 °C durante 15 minutos. Los fitorreguladores utilizados fueron la auxina ANA y las citocininas BAP y 2iP. A continuación se muestran las combinaciones hormonales para ápices con placa basal:

BA (mg/l)	ANA (mg/l)
0.5	0.12
0.5	0.5
1.0	0.12
1.0	0.5
2.0	0.12
2.0	0.5
3.0	0.12
3.0	0.5
4.0	0.12
4.0	0.5

Estas combinaciones se probaron a $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura con 16 h de luz y 1,000 lux de intensidad luminosa.

Las siguientes combinaciones para ápices con placa basal también se incubaron a 27 ± 2 °C con 16 h de luz y 1,000 lux de intensidad luminosa.

ZiP (mg/l)	ANA (mg/l)
0.5	0.12
0.5	0.50
1.0	0.12
1.0	0.50
2.0	0.12
3.0	0.12
3.0	0.50
4.0	0.12
4.0	0.50

Cuando se obtuvieron las plántulas, éstas se dividieron a la mitad y se subcultivaron en el mismo medio para la regeneración (fig. 4) y se le agregaron los siguientes reguladores del crecimiento BAP (0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 mg/l) y ANA (0.5 mg/l). Tanto la regeneración como las plántulas divididas a la mitad sobre el eje de crecimiento se incubaron a 27 °C con 16 h de luz y 1,000 lux.

Para los explantes de escams con placa basal del cultivar Cojumatlán se probaron las siguientes combinaciones:

BAP (mg/l)	ANA (mg/l)
0.5	0.5
1.0	0.5
2.0	0.5
3.0	0.5
4.0	0.5

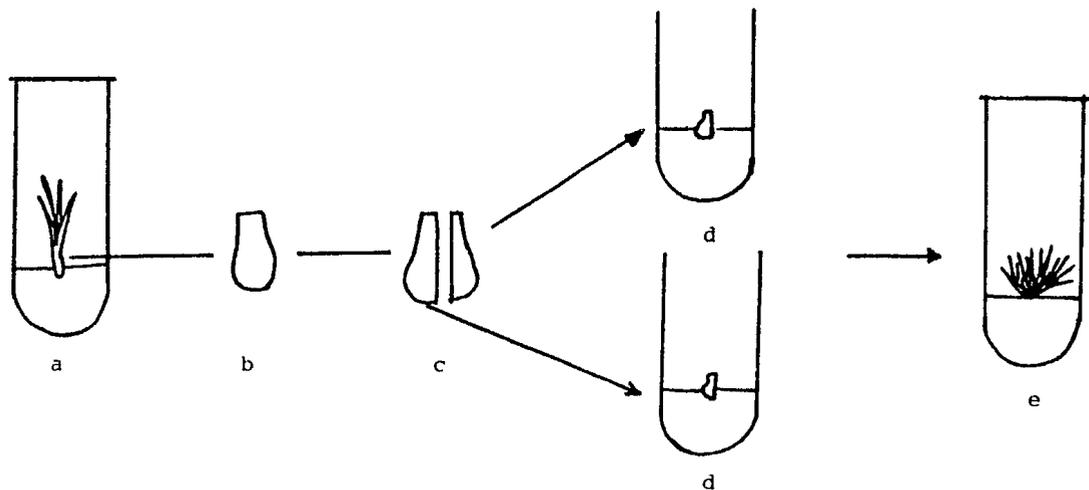


Fig. 4. División del bulbilllo obtenido in vitro a partir de ápices con placa basal: a) plántula regenerada en medio MS modificado por Hussey (1978) con BAP(0.5 - 4.0 mg/l) y ANA (0.12 y 0.5 mg/l) incubados a 27 ± 2 °C con 16 h de luz e intensidad luminosa de 1,000 lux; b) se le quitan hojas y raíces; c) el bulbo se divide en dos; d) se subcultiva en el mismo medio con BAP(0.5 - 4.0 mg/l) y ANA (0.5 mg/l); e) brotación múltiple a las cuatro semanas.

Los explantes de estas combinaciones se incubaron a 20 ± 2 °C con 16 h de luz y 1,700 lux de intensidad luminosa. Estos explantes también se probaron a 27 ± 2 °C con 16 h de luz y 1,000 lux de intensidad luminosa, a continuación se muestran las combinaciones de reguladores del crecimiento que se probaron bajo estas condiciones:

BAP (mg/l)	ANA (mg/l)
0.5	0.5
1.0	0.5
2.0	0.5
3.0	0.5
4.0	0.5
2.0	0.3

Los explantes de escamas o placa basal se colocaron en medio de cultivo con las siguientes combinaciones hormonales:

BAP (mg/l)	ANA (mg/l)
1.0	0.1
2.0	0.1
3.0	0.1
4.0	0.1
5.0	0.1
6.0	0.1
5.0	0.5
6.0	0.5
1.0	0.7
2.0	0.7

Se incubaron a 27 ± 2 °C con 16 h de luz y 1,000 lux de intensidad luminosa.

A continuación se muestran las combinaciones de BAP y ANA. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de 20 ± 2 °C con fotoperíodo de 16 h y una intensidad luminosa de 1,700 lux.

BAP (mg/l)	ANA (mg/l)
1.0	0.0
2.0	0.0
3.0	0.0
4.0	0.0
5.0	0.0
6.0	0.0
0.0	0.1
0.0	0.3
0.0	0.7
3.0	0.1
4.0	0.1
5.1	0.1
6.0	0.1
3.0	0.3
5.0	0.5
6.0	0.5
4.0	9.7
5.0	0.7
6.0	0.7

Debido a que hubo problemas para la formación de raíces en las plántulas obtenidas in vitro, se diseñaron experimentos para inducir las utilizando los siguientes reguladores del crecimiento y condiciones de cultivo: Medio de cultivo MS modificado por Hussey con 3 por ciento de sacarosa y 1 μ M de AIB, temperatura de 27 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h y una intensidad luminosa de 1,000 lux, con luz roja y luz blanca. También se probó el mismo medio y condiciones de incubación pero sin sacarosa y con luz blanca.

Otras pruebas de enraizamiento se hicieron con el medio de cultivo ya mencionado con Bap 1.0 mg/l y 2.0 mg/l y ANA 0.5 mg/l. También se probaron luz roja y blanca. Las condiciones de incubación fueron 27 ± 2 °C con fotoperíodo de 16 h y 1,000 lux de intensidad luminosa.

IV. 5. CONDICIONES DE INCUBACION

Se utilizaron dos condiciones de incubación. Una fué a temperatura de 27 ± 2 °C con fotoperíodo de 16 h y una intensidad luminosa de 1,000 lux.

La otra condición fué con una temperatura de 20 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h y una intensidad luminosa de 1,700 lux.

v. RESULTADOS Y DISCUSION

APICES CON PLACA BASAL. En las tablas 1 y 2 se observa la respuesta morfogénica de los explantes de ápices cuando se incubaron a 27 ± 2 °C con 16 h de luz y 1,000 lux de intensidad luminosa. La tabla 1 muestra las respuestas de los explantes cuando se agregó al medio de cultivo BAP (0.5 a 4.0 mg/l) combinada con ANA (0.5 y 0.12 mg/l). A las cuatro semanas se observó que en general hubo respuestas en todas las combinaciones con excepción de las siguientes: BAP= 1.0 mg/l + ANA = 0.5 mg/l y BAP = 3 mg/l + ANA=0.12 mg/l; en el primer caso un bajo porcentaje de explantes no presentó respuesta, ésto puede atribuirse no tanto a las condiciones de cultivo o a los reguladores del crecimiento, sino más bien a la posibilidad de haber dañado a los ápices durante la disección. En el segundo caso el porcentaje de norespuesta de 21.4 por ciento si es relativamente alto, aquí si podría especularse que en efecto hay una menor respuesta a esta concentración de reguladores del crecimiento y a las condiciones de temperatura, luz o fotoperíodo.

Las combinaciones que produjeron mayor número de plantas en promedio por explantes fueron BAP=2.0 y 4.0 mg/l combinados con ANA= 0.5 mg/l (Tabla 1.) sin embargo las combinaciones que tuvieron mayor número de explantes con brotación múltiple fueron BAP= 1.0 y 2.0 mg/l y ANA= 0.12 mg/l con 58.3 por ciento, cabe mencionar que el enraizamiento del que se habla aquí fué espontáneo y producido por tejido de explante como respuesta a las condiciones a las que se sometieron. Cuando el medio tuvo ANA y BAP a la concentración de 0.5 mg/l se presentó el más alto porcentaje de enraizamiento que fué del 25 por ciento en comparación con las otras combinaciones. Esto podría deberse a que las concentraciones de BAP mayores de 0.5 mg/l actúan en explantes de este cultivar, de tal manera que inhiben el desarrollo de raíces. Sin embargo cuando se baja la concentración de ANA a 0.12 mg/l, tampoco se observó formación de raíces por lo que se puede notar que es necesaria la combinación de ambos reguladores de crecimiento para el desarrollo de raíces (Dodds y Roberts,

TABLA 1. RESPUESTA DE APICES CON PLACA BASAL DE Allium cepa L. CULTIVAR COJUMATLAN CULTIVADOS EN MEDIO MS
 MODIFICADO Y CON DIFERENTES COMBINACIONES DE BAP Y ANA INCUBADOS A 27 ± 2 °C DE TEMPERATURA, 16 h
 DE LUZ Y 1,000 LUX DE INTENSIDAD LUMINOSA. (LECTURAS TOMADAS A LAS CUATRO SEMANAS)

REGULADORES DE CRECIMIENTO (mg/l)		No. DE EXPLANTES CON UNA PLANTULA		No. DE EXPLANTES CON BROTAION MULTIPLE.		No. DE EXPLANTES CON RAIZ.		No. PLANTULAS/EX PLANTE E INTERVALO			No. DE EXPLAN TES SIN RESP.	
BAP	ANA		(%)		(%)		(%)	X	INTER.			(%)
0.5	0.5	12/20	60.0	8/20	40.0	5/20	25.0	28/20	1.4	1-2	0/20	0.0
1.0	0.5	11/19	57.9	7/19	36.8	1/19	5.3	27/19	1.4	1-3	1/19	5.3
2.0	0.5	9/16	56.2	7/16	43.7	3/16	18.7	29/16	1.8	1-6	0/16	0.0
3.0	0.5	10/17	58.8	7/17	41.2	1/17	5.8	24/17	1.4	1-2	0/17	0.0
4.0	0.5	10/18	55.5	8/18	44.4	0/18	0.0	31/18	1.7	1-4	0/18	0.0
0.5	0.12	11/19	57.9	8/19	42.1	0/19	0.0	29/19	1.5	1-4	0/19	0.0
1.0	0.12	10/24	41.6	14/24	58.3	1/24	4.2	35/24	1.5	1-5	0/24	0.0
2.0	0.12	10/24	41.6	14/24	58.3	2/24	8.3	39/24	1.3	1-4	0/24	0.0
3.0	0.12	8/28	28.6	14/28	50.0	3/28	10.7	36/24	1.3	1-3	6/28	21.4
4.0	0.12	20/28	71.4	8/28	28.6	2/28	7.1	26/28	1.3	1-2	0/28	0.0

TABLA 2. RESPUESTA DE APICES CON PLACA BASAL DE *Allium cepa* L. CULTIVAR COJUMATLAN CULTIVADOS EN MEDIO MS MODIFICADO Y CON DIFERENTES COMBINACIONES DE 2iP Y ANA INCUBADOS A 27 ± 2 °C DE TEMPERATURA, 16 h DE LUZ Y 1,000 LUX DE INTENSIDAD LUMINOSA. (LECTURAS TOMADAS A LAS CUATRO SEMANAS).

REGULADORES DE CRECIMIENTO	2iP	ANA	No. DE EXPLANTES CON UNA PLANTULA		No. DE EXPLANTES CON BROTAACION MULTIPLE.		No. DE EXPLANTES CON RAIZ.		No. PLANTULAS/EX PLANTE E INTERVALO			No. DE EXPLAN TES SIN RESP.	
			(#)	(%)	(#)	(%)	(#)	(%)	X	INTER.	(#)	(%)	
	0.5	0.5	13/18	72.2	5/18	27.7	1/18	5.5	2/18	1.4	1-5	0/18	0
	1.0	0.5	12/19	63.1	6/19	31.6	4/19	21.0	17/19	0.9	1-3	0/19	0
	2.0	0.5	11/16	68.7	4/16	25.0	1/16	6.2	20/16	1.2	1-3	1/16	6.2
	3.0	0.5	10/18	55.5	5/18	27.7	1/18	5.5	22/18	1.2	1-3	3/18	16.6
	4.0	0.5	10/18	55.5	1/18	5.5	0/18	0	12/18	0.6	1-2	7/18	38.8
	0.5	0.12	15/18	83.3	0/18	0	1/18	5.5	15/18	0.8	1	3/18	16.6
	1.0	0.12	14/18	77.7	3/18	16.6	1/18	5.5	20/18	1.1	1-2	1/18	5.5
	2.0	0.12	13/18	72.2	5/18	27.7	1/18	5.5	23/18	1.3	1-2	0/18	0
	3.0	0.12	15/20	75.0	4/20	25.0	2/20	10.0	24/20	1.2	1-3	1/20	5.0
	4.0	0.12	14/19	73.7	4/19	21.0	2/19	10.5	23/19	1.2	1-2	1/19	5.3

1982).

En la tabla 2 se tienen los resultados de las combinaciones de 2iP con ANA. En éste cuadro se puede observar que hubo una mayor incidencia de explantes sin responder a las diferentes combinaciones, sobre todo cuando 2iP tuvo la concentración de 4.0 mg/l y ANA tuvo 0.5 mg/l con una proporción de 38.8 por ciento.

Cuando 2iP y ANA tuvieron la concentración de 0.5 mg/l se encontró el mayor promedio e intervalo de respuesta en la formación de plántulas (tabla 2). También se puede observar que la producción promedio de plántulas por explante y el intervalo son similares con las demás combinaciones de reguladores de crecimiento. A la concentración más baja de ambos reguladores del crecimiento, 2iP con 0.5 mg/l y ANA con 0.12 mg/l no se desarrolló la brotación múltiple. Cuando el medio tuvo 2iP a la concentración 1.0 mg/l y ANA a la concentración de 0.5 mg/l se encontró el mayor porcentaje en la formación de raíces.

Como se pone de manifiesto en las tablas 1 y 2 vemos que sí existen diferencias en la respuesta cuando se usan BAP y 2iP ya que BAP tiene un mayor efecto en la producción de plántulas, de brotación múltiple y de formación de raíces como lo demuestran los resultados. Esto no concuerda con lo reportado por Hussey (1978) ya que indica que 2iP y BAP tienen efectos muy similares para explantes de ápices de cebolla, sin embargo, los datos concuerdan con aquellos informados por Rubluo et al. (1984) quienes trabajando con hoja inmadura de chícharo no lograron inducir morfogénesis en presencia de 2iP y ANA, en cambio con BAP y ANA tuvieron una buena respuesta morfológica. Estas diferencias son debidas probablemente a efectos genotípicos de los explantes mismos como lo han propuesto Mok y Mok (1977).

Una vez que se obtuvieron las plántulas con las condiciones de las tablas 1 y 2, se separaron y se le quitaron las hojas y raíces en caso de que las tuvieran y se dividieron a la mitad con

el objeto de suprimir la dominancia apical, ya que, como lo reporta Hussey (1982) el éxito para la formación de yemas axilares y adventicias depende del grado de dominancia apical mostrado por el cultivar, de tal forma que suprimiendo a ésta se permita el desarrollo de las plántulas. Los resultados se pueden ver en la tabla 3. Como se puede observar, el porcentaje de explantes sin respuesta fué muy bajo con excepción de la combinación BAP= 2mg/l con ANA =0.5 mg/l. El porcentaje de brotación múltiple en las cinco combinaciones es en general alto, siendo el mayor porcentaje de 100 por ciento con la combinación Bap = 2.0 mg/l y ANA = 0.5 mg/l y el más bajo fue de 87.5 por ciento, con la combinación BAP = 4,0 mg/l con ANA= 0.5 mg/l. El mejor desarrollo de plántulas por explante se obtuvo con la combinación de BAP=1.0 mg/l con ANA= 0.5 mg/l, los cuales dieron un promedio de 3 plántulas por explante.

También puede observarse que el intervalo de formación de plántulas fué muy variable y precisamente la combinación que presentó mayor número de plántulas por explante fué la que tuvo un intervalo más amplio de formación de plántulas.

La combinación que produjo la mayor frecuencia de enraizamiento espontáneo de estas combinaciones fue BAP=2.0 mg/l combinada con ANA =0,5 mg/l.

Estos resultados indican que hay que hacer más pruebas con este explante ya sea cambiando factores ambientales o reguladores del crecimiento para tratar de obtener un óptimo en la producción de plántulas.

En las tablas 1, 2 y 3 se observa algo en común, cuando el medio de cultivo tuvo BAP= 4.0 mg/l con ANA= 0.5 mg/l no hubo formación de raíces en ninguno de los casos. Según Stenlid en 1982 propuso que la presencia de auxinas y citocininas en una cierta relación estimula la producción de etileno el cual inhibe la formación de raíces por lo que el balance de reguladores de crecimiento juega un papel importante en el tipo de respuesta (Evans, et al., 1981).

TABLA 3. RESPUESTA DE MITADES DE BULBOS DE Allium cepa L. CULTIVAR COJUMATLAN, OBTENIDOS DE APICES REGENERADOS IN VITRO, SUBCULTIVADOS EN MEDIO MS MODIFICADO Y CON DIFERENTES COMBINACIONES DE BAP Y ANA INCUBADOS A 27 ± 2 °C CON FOTOPERIODO DE 16 h. DE LUZ Y 1,000 LUX DE INTENSIDAD LUMINOSA. (LECTURAS TOMADAS A LAS CUATRO SEMANAS).

REGULADORES DE CRECIMIENTO (mg/l)		No. DE EXPLANTES CON UNA PLANTULA (%)		No. DE EXPLANTES CON BROTAION MULTIPLE (%)		No. DE EXPLANTES CON RAIZ. (%)		No. DE PLANTULAS/EX PLANTE E INTERVALO. X INTER.		No. EXPLANTES SIN RESPUESA. (%)		
0.5	0.5	0	0	51/53	96.0	17/53	32	51/53	0.96	2-6	0	0
1.0	0.5	1/48	2.1	47/48	97.9	18/48	37.5	80/48	2.96	1-13	2/48	4.2
2.0	0.5	0	0	29/29	100.0	14/29	48.2	39/29	1.3	2-6	5/29	17.2
3.0	0.5	3/38	7.9	35/38	92.1	2/38	5.2	27/38	1.13	1-10	0	0
4.0	0.5	4/32	12.5	28/32	87.5	0/32	0	15/32	0.55	1-5	0	0

ESCAMAS CON PLACA BASAL (cv) Cojumatlán. Se observó un efecto de la temperatura y en general la respuesta fué mejor a la temperatura más alta probada (27 ± 2 °C). En las tablas 4 y 5 puede observarse que es alto el porcentaje de explantes sin respuesta. En ninguna combinación hubo formación de una sola plántula ya que a las escamas se les había quitado los ápices (meristemas apicales). Cuando el medio fué suplementado con BAP (1.0 mg/l) y ANA (0.5 mg/l), hubo un porcentaje del 33.3 por ciento de formación de brotación múltiple (tabla 4), este porcentaje fué el más alto de las cinco combinaciones bajo condiciones de 20 ± 2 °C y 1,000 lux.

En cambio a 27 ± 2 °C la combinación de BAP (4.0 mg/l) más ANA (0.5 mg/l) dió el mayor porcentaje de brotación múltiple, siendo éste de 39.0 por ciento (tabla 5).

La combinación que dió el mayor número de plantas por explante fue BAP (4.0 mg/l) combinado con ANA (0.5 mg/l). El promedio fué de 3.17 plántulas a temperatura de 27 ± 2 °C (tabla 5). En la condición de 20 ± 2 °C con 1,700 lux de intensidad luminosa la combinación que dió mejor respuesta fué BAP (2.0 mg/l) y ANA (0.5 mg/l) ya que dió un promedio de 2.0 plántulas por explante. Esto no está de acuerdo con los resultados obtenidos por Fujieda y col. (1977) quienes encontraron que para Allium fistulosum L. hubo mayor número de plantas cuando la temperatura en que se incubaron sus explantes, fué de 20 °C que cuando fué de 25 °C. Hussey (1978) y Fujieda y colaboradores en 1977 usaron intensidades luminosas de 8,000 y 3,000 lux respectivamente, lo cual nos lleva a pensar que necesitan de mayor intensidad luminosa estos explantes ya que se observa que en efecto la formación de plántulas por explante fué mayor en la condición de 1,700 lux de intensidad luminosa (tabla 4), o bien que las combinaciones hormonales que estuvieron en cada prueba en particular son la causa de las diferentes respuestas observadas.

TABLA 4. RESPUESTA DE ESCAMAS CON PLACA BASAL DE Allium cepa L. CULTIVAR COJUMATLAN CULTIVADAS EN MEDIO MS MODIFICADO Y CON DIFERENTES COMBINACIONES DE BAP Y ANA INCUBADAS A 20 ± 2 °C DE TEMPERATURA, 16 h Y 1,700 LUX DE INTENSIDAD LUMINOSA. (LECTURAS TOMADAS A LAS SIETE SEMANAS)

REGULADORES DE CRECIMIENTO (mg/l)		No. DE EXPLANTES CON UNA PLANTULA (%)		No. DE EXPLANTES CON BROTAION MULTIPLE (%)		No. DE EXPLANTES CON RAIZ (%)		No. DE PLANTULAS/EX PLANTE E INTERVALO. X INTER.			No. EXPLANTES SIN RESPUESTA. (%)	
BAP	ANA											
0.5	0.5	0/21	0.0	1/21	4.8	2/21	9.5	6/21	0.0	6	20/21	95.2
1.0	0.5	0/21	0.0	7/21	33.3	1/21	4.8	35/21	1.6	2-8	14/21	66.6
2.0	0.5	0/20	0.0	4/20	2.0	3/20	15.0	48/20	2.4	2-18	16/20	80.0
3.0	0.5	0/23	0.0	2/23	8.7	2/23	8.7	6/23	0.3	3	21/23	91.3
4.0	0.5	0/20	0.0	1/20	5.0	1/20	5.0	3/20	0.1	3	19/20	95.0

TABLA 5. RESPUESTA DE ESCAMAS CON PLACA BASAL DE Allium cepa L. CULTIVAR COJUMATLAN CULTIVADAS EN MEDIO MS MODIFICADO Y CON DIFERENTES COMBINACIONES DE BAP Y ANA INCUBADAS A 27 + 2 °C DE TEMPERATURA, 16 h DE LUZ Y 1,000 LUX DE INTENSIDAD LUMINOSA. (LECTURAS TOMADAS A LAS SIETE SEMANAS)

REGULADORES DE CRECIMIENTO (mg/l)		No. DE EXPLANTES CON UNA PLANTULA		No. DE EXPLANTES CON BROTAION MULTIPLE		No. DE EXPLANTES CON RAIZ		No. DE PLANTULAS/EX PLANTE E INTERVALO			No. EXPLANTES SIN RESPUESTA	
BAP	ANA		(%)		(%)		(%)	X	INTER.		(%)	
0.5	0.5	0/20	0.0	2/20	10.0	1/20	5.0	5/20	0.25	2-3	17/20	85.0
1.0	0.5	0/23	0.0	2/23	8.7	3/23	13.0	4/23	0.17	2	18/23	78.3
2.0	0.5	0/21	0.0	2/21	4.8	4/21	19.0	3/21	0.14	3	18/21	85.7
3.0	0.5	0/20	0.0	2/20	10.0	0/20	0.0	5/20	0.25	2-3	18/20	90.0
4.0	0.5	0/23	0.0	9/23	39.0	6/23	26.1	73/23	3.17	2-3	13/23	56.5
2.0	0.3	0/28	0.0	5/28	17.8	8/28	28.6	14/28	0.5	2-3	16/28	57.1

ESCAMAS CON PLACA BASAL (cv. Suprema). En general puede observarse en las tablas 6 y 7 que la respuesta fué sumamente pobre para este cultivar, particularmente a 27 ± 2 °C (tabla 6).

La tabla 7 nos muestra la respuesta de las escamas bajo condiciones de 20 ± 2 °C de temperatura y 1,700 lux de intensidad luminosa.

En la tabla 7 se muestra que cuando se probaron diferentes combinaciones de BAP (1.0 a 6.0 mg/l) sin ANA, la menor respuesta se encontró entre 2.0 y 3.0 mg/l). Cuando BAP estuvo en el medio a una concentración de 6.0 mg/l el porcentaje de brotes múltiples fué de 33.3 por ciento el cual fué el mayor de las seis combinaciones, también fué la combinación que mostró la mayor formación de plántulas por explante (1.3) y mayor enraizamiento.

Lo anterior concuerda con lo mencionado por Evans et al. (1981) el cual nos dice que se ha utilizado BAP con una frecuencia del 43.8 por ciento para inducir organogénesis somática directa, esto es, regeneración de plántulas sin haber una previa formación de callo.

En la tabla 7 también se observa que cuando se utilizaron combinaciones de BAP con ANA se encontró aún mayor número de plántulas por explante. A las combinaciones de BAP = 4.0 y 5.0 mg/l y ANA = 0.7 mg/l se encontró la mayor formación de plántulas, en especial con 5.0 mg/l de BAP se obtuvieron 2.6 plántulas por explante en promedio. Como puede verse para las escamas con placa basal es necesario suplementar el medio con citocininas y auxinas a concentraciones relativamente altas, esto no coincide con lo mencionado por Hussey (1978) quien indica que las monocotiledóneas generalmente no necesitan de auxinas pero si de citocininas aún en pequeñas cantidades aunque también hay especies que no la requieren.

Cuando se probó ANA (0.3 mg/l) con BAP (3.0 mg/l) (tabla 7), hubo un aumento en el porcentaje de respuesta al aumentar la concentración de BAP. En cambio con ANA a 0.5 mg/l combinado con 5.0 y 6.0 mg/l de BAP hubo una disminución drástica hasta casi la mitad de

TABLA 6. RESPUESTA DE ESCAMAS CON PLACA BASAL DE Allium cepa L. CULTIVAR SUPREMA CULTIVADAS EN MEDIO MS MODIFICADO Y CON DIFERENTES COMBINACIONES DE BAP Y ANA INCUBADAS A 27 ± 2 °C DE TEMPERATURA, 16 h DE LUZ Y 1,000 LUX DE INTENSIDAD LUMINOSA. (LECTURAS TOMADAS A LAS SIETE SEMANAS)

REGULADORES DE CRECIMIENTO BAP	DE (mg/l) ANA	No. DE EXPLANTES CON UNA PLANTULA		No. DE EXPLANTES CON BROTAION MULTIPLE		No. DE EXPLANTES CON RAIZ		No. DE PLANTULAS/EX PLANTE E INTERVALO			No. DE EXPLAN TES SIN RESP.	
		(#)	(%)	(#)	(%)	(#)	(%)	X	INTER.	(#)	(%)	
1.0	0.1	0/21	0.0	0/21	0.0	0/21	0.0	0/21	0.0	0	21/21	100.0
2.0	0.1	2/24	8.3	1/24	4.2	1/24	4.2	5/24	0.2	1-3	21/24	87.5
3.0	0.1	0/18	0.0	0/18	0.0	1/18	5.5	0/18	0.0	0	17/18	94.4
4.0	0.1	0/20	0.0	0/20	0.0	6/20	30.0	0/20	0.0	0	14/20	70.0
5.0	0.1	0/18	0.0	1/18	5.5	3/18	16.6	1/20	0.0	1	15/18	83.3
6.0	0.1	0/18	0.0	0/18	0.0	0/18	0.0	0/18	0.0	0	18/18	100.0
5.0	0.5	3/21	14.3	3/21	14.3	4/21	19.0	41/21	2.0	1-20	14/21	66.6
6.0	0.5	0/20	0.0	0/20	0.0	1/20	5.0	0/20	0.0	0	19/20	95.0
1.0	0.7	1/22	4.5	0/20	0.0	0/20	0.0	0/20	0.0	0	21/22	95.5
2.0	0.7	0/18	0.0	0/18	0.0	2/18	11.1	0/18	0.0	0	16/18	88.8

TABLA 7. RESPUESTA DE ESCAMAS CON PLACA BASAL DE Allium cepa L. CULTIVAR SUPREMA CULTIVADAS EN MEDIO MS MODIFICADO
 Y CON DIFERENTES COMBINACIONES DE BAP Y ANA INCUBADAS A 20 + 2 °C CON 16 h DE LUZ Y 1,700 LUX DE INTENSI
 DAD LUMINOSA. (LECTURAS TOMADAS A LAS SIETE SEMANAS)

REGULADORES DE CRECIMIENTO (mg/l)		No. DE EXPLANTES CON UNA PLANTULA	No. DE EXPLANTES CON BROTAION	No. DE EXPLANTES CON RAIZ	No. DE PLANTULAS/EX PLANTE E INTERVALO	No. DE EXPLAN TES SIN RESP.				
BAP	ANA	(%)	MULTIPLE (%)	(%)	X INTER.	(%)				
1.0	0.0	0/21	0.0	0/21	0.0	4/21 19.0	0/21 0.0	0	13/21	61.9
2.0	0.0	0/18	0.0	0/18	0.0	2/18 11.1	0/18 0.0	0	16/18	88.8
3.0	0.0	0/15	0.0	1/15	6.6	4/15 26.6	2/15 0.1	2	11/15	73.3
4.0	0.0	1/18	5.5	1/18	5.5	1/18 5.5	8/18 0.4	7	11/18	61.1
5.0	0.0	2/21	9.5	3/21	14.3	5/21 23.8	9/21 0.4	3-5	13/21	61.9
6.0	0.0	0/15	0.0	5/15	33.3	6/15 40.0	20/15 1.3	2-11	9/15	60.0
0.0	0.1	1/24	4.2	2/24	8.3	8/24 33.3	6/24 0.3	2-3	15/24	62.5
0.0	0.3	1/18	5.5	0/18	0.0	9/18 50.0	1/18 0.0	1	9/18	50.0
0.0	0.7	0/12	0.0	0/12	0.0	1/12 8.3	0/12 0.0	0	11/12	91.6
2.0	0.1	2/23	8.7	1/23	4.3	9/23 39.3	5/23 0.2	3	11/23	47.8

REGULADORES DE CRECIMIENTO (mg/l) BAP	No. DE EXPLANTES CON UNA PLANTULA (%)	No. DE EXPLANTES CON BROTAION		No. DE EXPLANTES CON RAIZ		No. DE PLANTULAS/EX PLANTE E INTERVALO		No. DE EXPLAN TES SIN RESP.				
		ANA	(%)	MULTIPLE	(%)	(%)	X	INTER.	(%)			
3.0	0.1	0/22	0.0	0/22	0.0	9/22	40.9	0/22	0.0	0	13/22	59.0
4.0	0.1	0/20	0.0	0/20	0.0	0/20	0.0	0/20	0.0	0	20/20	100.0
5.0	0.1	0/27	0.0	0/27	0.0	0/27	0.0	0/27	0.0	0	27/27	100.0
6.0	0.1	0/22	0.0	3/22	13.6	7/22	31.8	8/22	0.4	1-4	11/22	50.0
3.0	0.3	2/18	11.1	2/18	11.1	4/18	22.2	5/18	0.3	1-3	12/18	66.6
5.0	0.5	4/29	13.8	2/29	6.9	6/29	20.7	27/29	0.9	1-21	15/29	51.7
6.0	0.5	0/20	0.0	0/20	0.0	0/20	0.0	0/20	0.0	0	20/20	100.0
4.0	0.7	0/22	0.0	4/22	18.2	2/22	9.1	32/22	1.5	1-5	17/22	77.2
5.0	0.7	1/26	3.8	6/26	23.1	4/26	15.4	67/26	2.6	1-38	16/26	61.5
6.0	0.7	0/20	0.0	1/20	0.0	3/20	15.0	2/20	0.1	2	14/20	70.0

de la respuesta cuando se aumentó la concentración de BAP a 6.0 mg/l. Esto puede deberse a que los explantes contienen citocininas endógenas y al estar en un medio al que se le ha suplementado con citocininas se produce un efecto inhibitorio para la formación de tallos y raíces como lo mencionan Doods y Roberts (1982).

En las combinaciones de ANA (0.7 mg/l) con BAP (4.0, 5.0 y 6.0 mg/l) la respuesta fué muy baja y cuando BAP estuvo ausente no hubo respuesta de ningún tipo (tabla 7), lo cual indica que los explantes a pesar de tener citocininas endógenas requieren de un suplemento determinado para que se dé la inducción de tallos y raíces.

ENRAIZAMIENTO. A pesar de que la combinación BAP/ANA ha sido utilizada con éxito para la inducción de organogénesis (Evans, 1981) Rubluo, et al. 1984) en nuestro caso no se presentó esto y puede deberse a la naturaleza del explante en sí o a que no se detectó la relación adecuada de la BAP/ANA (Thorpe, 1982). Las concentraciones de BAP que se utilizaron fueron 1.0 y 2.0 mg/l con 0.5 mg/l de ANA y se probaron también las condiciones de luz roja y luz blanca a 27 ± 2 °C y 16 h de luz (tabla 8). En la luz roja el mejor número de raíces por plántula fué de 3.1 cuando BAP estuvo a la concentración de 2.0 mg/l, pero 1.0 mg/l también hubo formación de raíces, las plántulas tuvieron 2 raíces en promedio, en cambio con la luz blanca sólo cuando BAP estuvo a la concentración de 2.0 mg/l hubo formación de una raíz por plántula. Cuando BAP estuvo a la concentración de 1.0 mg/l, la respuesta fué de 0.3 raíces por plántula. Murashige (1974) reportó que la luz roja aumenta la inducción en la formación de raíces, lo cual está de acuerdo con estos resultados.

Se investigó la inducción de raíces con AIB el cual se utilizó a la concentración de 1 μ M. Además se probó el efecto de la luz roja y luz blanca. En esta prueba (tabla 9) se encontraron respuestas mucho mejores que en la anterior, con la luz roja a la primera semana ya se tenían resultados, se tuvo un promedio de 7.2 raíces/explante con una respuesta de 100 por ciento mientras que con la luz

TABLA 8. RESPUESTA A LA FORMACION DE RAICES INDUCIDAS EN PLANTULAS DE Allium cepa L. SUBCULTIVADAS EN MEDIO MS MODIFICADO Y SUPLEMENTADO CON BAP Y ANA A 27 + 2 °C FOTOPERIODO DE 16 h Y DIFERENTES CALIDADES DE LUZ. (LECTURAS TOMADAS A LOS 20 DIAS)

LUZ	REGULADORE DE CRECIMIENTO (mg/l)		FORMACION DE RAICES (%)	No. PROMEDIO DE RAICES/EXPLANTE \bar{X}	
	BAP	ANA			
BLANCA	1.0	0,5	12/20	10.0	6/20 0.3
	2.0	0.5	7/21	33.3	22/21 1.0
ROJA	1.0	0.5	8/16	25.0	32/16 2.0
	2.0	0.5	8/12	66.6	37/12 3.1

TABLA 9. RESPUESTA A LA FORMACION DE RAICES INDUCIDAS EN PLANTULAS DE Allium cepa L. SUBCULTIVADAS EN MEDIO MA MODIFICADO Y SUPLEMENTADO CON 1 μ M de AIB A 27 ± 2 °C , FOTOPERIODO DE 16 h Y DIFERENTES CALIDADES DE LUZ. (LECTURAS TOMADAS A LOS 20 DIAS)

LUZ	FORMACION DE RAICES		No. PROMEDIO DE RAICES/ EXPLANTE	\bar{X}
	20/20	(%)		
BLANCA	20/20	100	108/24	4.5
ROJA	20/20	100	145/20	7.2

de la técnica del CTV puede ser de gran valor por su factible aplicación a problemas de esta naturaleza.

IV. CONCLUSIONES

BAP tiene mayor efecto en la formación de plántulas, raíces y brotación múltiple que 2iP para los ápices con placa basal del cultivar Cojumatlán.

Sería conveniente probar temperaturas más bajas para tratar de encontrar una mayor formación de plántulas.

Las mitades de los bulbos que se cultivaron in vitro tuvieron mayor número de plántulas por explante que los ápices, también sería conveniente probar temperaturas menores ya que varios trabajos indican que las mejores respuestas para la regeneración se obtuvo a los 20 °C para bulbos (fujieda, et al., 1977; Hussey, 1978).

Para el cultivar Cojumatlán la mejor respuesta fue a 27 ± 2 °C con BAP (4.0 mg/l) combinado con ANA (0.5 mg/l) ya que formó 3.2 plántulas por explante. A 20 ± 2 °C también se obtuvo buena respuesta cuando se suplementó el medio con BAP (2.0 mg/l) con ANA (0.5 mg/l) que fue de 2.4 plántulas.

En general los explantes de escamas con placa basal del cultivar Cojumatlán tuvieron mejor respuesta que los explantes del cultivar Suprema tanto de plántulas como de brotación múltiple

En el cultivar Cojumatlán las escamas tuvieron mejor respuesta de que los ápices con placa basal.

Las diferencias en la respuesta de los explantes de los cultivares antes mencionados puede deberse a la variabilidad que existe entre cultivares de la misma especie lo cual confirma lo mencionado por Rubluo, et al., (1982).

Las mejores condiciones para el enraizamiento de plántulas del cultivar Cojumatlán fueron luz roja con 27 ± 2 °C de temperatura y fotoperíodo de 16 h .

APENDICE I. MEDIO MS MODIFICADO POR HUSSEY (1978)

Para preparar un litro de medio de cultivo

MACRONUTRIMENTOS

NH_4NO_3	825 mg/l
KNO_3	800 mg/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	185 mg/l
KH_2PO_2	85 mg/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	220 mg/l

MICRONUTRIMENTOS

KI.....	0.83 mg/l
H_3BO_3	6.2 mg/l
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3 mg/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.3 mg/l
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25 mg/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025mg/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025mg/l

SOLUCION Fe

CON EDTA

Na_2EDTA	37.7 mg/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8 mg/l
	<hr/>
	65.5 mg/l

SOLUCION DE

INOSITOL

Inositol.....	100.0 mg/l
---------------	------------

VITAMINAS

Acido nicotínico....	5.0 mg/l
Piridoxina HCl.....	1.0 mg/l
Tiamina.....	0.5 mg/l

SOLUCION DE

GLICINA

Glicina.....	2.0 mg/l
--------------	----------

Hussey modifica la solución de fierro a 25 mg/l. El pH=5.7-5.8

APENDICE II. SOLUCIONES CONCENTRADAS PARA EL MEDIO MS MODIFICADO POR
HUSSEY (1978)

MACRONUTRIMENTOS

SOLUCION STOCK A	$\text{NH}_4 \text{NO}_3$	16,500 mg/10 l.
20 litros X 400 ml	KNO_3	19,000 mg/10 l.
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,700 mg/10 l.
	KH_2PO_4	1,700 mg/10 l.
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,400 mg/10 l.

MICRONUTRIMENTOS

SOLUCION STOCK B	KI.....	8.3 mg/10 l.
10 litros X 100 ml	H_3BO_3	62.0 mg/10 l.
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	223.0 mg/10 l.
	$\text{ZnMoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	86.0 mg/10 l.
	$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.5 mg/10 l.
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.25mg/10 l.
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.25mg/10 l.

SOLUCION STOCK C

20 litros X 100 ml	Na_2EDTA	373 mg/10 l.
	FeSO_4	278 mg/10 l.

SOLUCION STOCK D

20 litros X 100 ml	Inositol	100 mg/10 l.
--------------------	----------------	--------------

VATAMINAS MS

SOLUCION STOCK E	Acido nicotínico ...	50.0 mg/10 l.
	Piridoxina HCl.....	10.0 mg/10 l.
	Tiamina	5.0 mg/10 l.

SOLUCION DE

GLICINA

10 litros X 100 ml	Glicina.....	20 mg/l
--------------------	--------------	---------

BIBLIOGRAFIA

- Albertos, P. F. et al., 1971. Cultivo de la cebolla I. Diez temas sobre la huerta (II). Ed. Ministerio de Agricultura, 2^a Ed. Madris. España: 9 - 50.
- Arditti, J. y Strauss. 1979. Taro Tissue Culture Manual. South Pacific Commission: 1 - 53.
- Bailey, L. H. 1977. Manual of cultivated Plants. Mac. Millan, Eleventh Printing. Toronto, Ontario: 245 - 246.
- Cabrera, P. J., 1982. Origen, desarrollo y proyección de la producción Nacional de Semillas. PRONASE, México.
- Caldas, I., O, J, Cromo y W.R. Sharp. 1975. Handbook of Plant Tissue Culture, Part I. Application of Nuclear Energy for the Study of Cellular and Developmental Biology. CENA, Piracaba. Ed. W.R. Sharp y O.J. Cromo: 13 - 25.
- Cronquist, A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia Univ. Press. New York: 1208 - 1211.
- Dodds, J. H. y L. W. Roberts. 1982. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge Univ. Press, Cambridge: 1 - 9.
- Dunstan D. I. y K. C. Short. 1979 b. Shoot Production from Cultivated Allium porrum Tissues. Scientia Horticulturae. II: 37 - 43.
- Dunstan, D.I. y K. C. Short. 1979 a. Shoot Production from the flowers Head of Allium cepa L. Scientia Horticulturae. 10: 345 -356.

Eskin, N. A. 1979. Plant Pigments, Flavours and Textures: The Chemistry and Biochemistry of Selected Compounds. Academic Press. U.S.A.: 45 - 58.

Font Quer, P. 1980. Plantas Medicinales. Ed. Labor. Sexta edición. Barcelona: 890 - 892.

Fridborg, G. 1971. Growth and Organogenesis in Tissue Cultures of Allium cepa var. proliferum. Physiol. Plant., 25: 246 - 440.

Fujieda, K., Y. Ando y Y. Fujita. 1977. Propagation of Welsh Onion through Soot Tip Culture. J. Fac. Agr., Kyushu Univ. 22: 89 - 98.

Gamborg, O.L., T. Murashige, T.A. Thorpe e I.K. Vasil. 1976. Plant Tissue Culture Media. In vitro. 12: 473 - 478.

Gamborg, O. L., 1984. Plant Cell Cultures. Nutrition and Media en: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of plants. I Ed. Vasil I.K. Academic Press Inc: 19 - 23.

García, A.M. 1979 a. Enfermedades de las Plantas de la República Mexicana. Ed. LIMUSA. México: 93.

Gautheret, R. J. 1982. Plant Tissue Culture: The History. En: Plant Tissue Culture. Proc. 5 th Intl: Cong. Plant Tissue and Cell Culture. Ed. A. Fujiwara, Japanese. Assoc. of Plant Tissue Culture. Tokio:7-12.

George, E, F. y P.D. Sherrington, 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Comercial Laboratories. Edited by Exaletics Limited. Gran Bretaña.

Hall, R. H. 1976 Hormonal Mechanism for differentiation in Plant Tissue Culture. *In Vitro*. 12: 216-224.

Hoffman, C. A. 1933. Developmental Morphology of Allium cepa. *Botanical Gazette*. 95: 279-299.

Hussey, G. 1978. *In Vitro* propagation of Onion (Allium cepa). *Scientia Horticulturae*. 10 (4): 345-356.

Hussey, G. 1978. *In vitro* propagation of monocotyledonous bulbs and corms. En: *Plant Tissue Culture. Proc. 5 th Intl. Cong Plant Tissue and Cell Culture*. Ed. A. Fujiwara, Japanese. Assoc. of Plant Tissue Culture. Tokio.: 677-680.

Hutchinson, J. 1959. Families of flowering plants monocotyledons. Ed. Oxford University Press, Amen House, London. 4: 639-640.

Martínez, M. 1939. Las Plantas Medicinales de México. Ed. Botas, México.: 66-67.

Milton, J.P. 1974. Mejoramiento Genético de las Cosechas. Ed. LIMUSA. México.: 64-67.

Mok, M.C. y D.W.S. Mok. 1977. Genotypic Responses to auxins in tissue cultures of Phaseolus. *Physiol. Plant*. 40: 261-264.

Montes, F. 1972. El Cultivo de la Cebolla en México. *Novedades Hortícolas*. XVII (1-4): 8-18.

Murashige, T. y F. Skoog. 1961. A Revised Medium for Rapid Growth and Biosays with Tobacco Tissue Culture. *Physiol. Plant* 15.:473-494.

Murashige T. 1974. Plant Propagation Throught Tissue Cultures. Ann. Rev. Plant. Physiol. 25.:135-166.

Murashige T. 1978. The Impact of Plant Tissue Culture on Agriculture. En. Frontiers of Plant Tissue Culture. Ed. T.A. Thorpe, IAPTC, Calgary: 15-26.

Nome, S. F., A.Abril y R.Racca. 1981. Obtención de plantas de ajo (Allium sativum L.) libres de virus mediante el cultivo de meristemas apicales: ØYTON. 41: 139-151.

Rubluo, A.L. Mrosinski y K. K. Kartha (1981). En: Plant Tissue Culture. Ed. A. Fujiwara, Japan: 151-152.

Rubluo, A.,K. K. Kartha, L.A. Mroginski y J. Dick. 1984. Plant Regeneration from Pea Leaflets Cultures in vitro and Genetic Stability of Regenerants. Z. Pflanzenphysiologie.

Salisbury, F.B. y C.W. Ross. 1978. Plant Physiology. Wadsworth Publ Col., California: 422.

S.A.R.H. 1974. Primer catálogo de insectos fitófagos de México. Fitófilo XXVII (69): 3-176. S.A.R.H. México.

Street, H.E. 1977. Old Problems and New Perspectives. En: Plant Tissue and Cell Culture. Ed. H.E. Street, Blackwell Scientific Publ., Oxford: 501-511.

Thorpe T.A. 1982. Callus Organization and de novo Formation of Shoots roots and embryos in vitro In: Application of Plant Cell and Tissue Culture to Agriculture and Industry. 1982. Tomes et al. Published by the University of Guelph, Guelph.

Thorpe T.A. y K.R. Patel. 1984. Clonal propagation: Adventitious Buds. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vasil I.K. Vol. I. Ed. Academic Press Inc. 49-60.

Evans D.A. y W.R. Sharp. 1981. Growth and Behavior of cell Cultures. Embryogenesis and Organogenesis. En: Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture. Ed. T.A. Thorpe. Academic Press. New York: 45-113.