



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRICOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GENÉTICA

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CEBOLLA
(Allium cepa L.)
MEDIANTE BIOBALÍSTICA

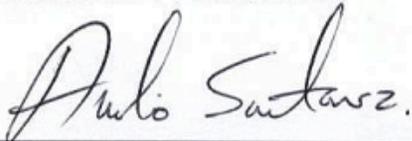
MARÍA ELENA QUINTANA SIERRA

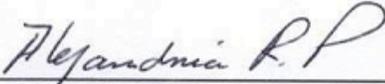
T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

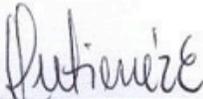
MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO
2009

La presente tesis titulada: **Transformación genética de cebolla (*Allium cepa* L.) mediante biobalística** realizada por la alumna: **María Elena Quintana Sierra**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GENÉTICA

CONSEJERO: 
DR. AMALIO SANTACRUZ VARELA

DIRECTORA: 
DRA. ALEJANDRINA ROBLEDO PAZ

ASESOR: 
DRA. MA. ALEJANDRA GUTIÉRREZ ESPINOSA

ASESOR: 
DR. GUILLERMO CARRILLO CASTAÑEDA

ASESOR: 
DR. JOSÉ LUIS CABRERA PONCE

Montecillo, Texcoco, Estado México, agosto de 2009

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CEBOLLA (*Allium cepa* L.) MEDIANTE BIOBALÍSTICA

María Elena Quintana Sierra, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2009

El objetivo de la presente investigación fue desarrollar un protocolo de transformación genética de cebolla mediante biobalística, para lo cual fue necesario establecer un sistema eficiente de regeneración de cebolla *in vitro*. La metodología desarrollada permite la regeneración de plantas de las variedades Cristal y El Toro. La variedad Cristal mostró mayor porcentaje de explantes con plantas y mayor número de plantas por explante. Se obtuvieron plantas después de 16 semanas de haber iniciado el cultivo y éstas formaron microbulbos, los cuales alcanzaron hasta 3 cm de diámetro cuando se transplantaron en invernadero. La respuesta *in vitro* obtenida superó a la reportada por otros autores. Mediante el sistema de bombardeo de alta presión, las micropartículas de tungsteno se recubrieron con el ADN del plásmido pWRG1515, cotransformando con el plásmido rdtas, el plásmido ODC y el plásmido CS. Los callos embriogénicos obtenidos pueden emplearse para incorporar transgenes a la planta de cebolla y son capaces de expresar el gen *gusA* después de un año y medio. La naturaleza del material transformado fue confirmada por la prueba de PCR para el gen *gusA* y *hph* siendo positiva. La obtención de plantas normales no fue posible, pero son los inicios para la transformación de cultivares de cebolla que se siembran en México.

Palabras clave: *Allium cepa*, callos embriogénicos, cultivo de tejidos, cotransformación.

GENETIC TRANSFORMATION OF ONIONS (*Allium cepa* L.) THROUGH BIOBALISTICS

María Elena Quintana Sierra, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2009

The objective of this research was to develop a protocol for genetic transformation of onion through biobalistics; therefore, it was necessary to establish an efficient system of onion *in vitro* regeneration. The developed methodology allows plant regeneration for Cristal and El Toro varieties. Cristal variety showed larger percentage of explants with plants and more plants per explant. Plants were obtained after 16 weeks of culture and they formed microbulbos, which reached up to 3 cm in diameter when transplanted into greenhouse. The *in vitro* response obtained exceeded the one reported by other authors. For the high pressure bombardment system, tungsten microparticles were coated with pWRG1515 DNA plasmid, cotransforming with plasmid rdtas, ODC and CS plasmids. Embryogenic callus obtained can be used to incorporate transgenes to onion plants and are able to express the *gusA* gene after a year and a half. The nature of transformed material was confirmed by PCR tests for the *gusA* and *hph* genes and it was positive. Obtaining normal plants was not possible, but it is the beginning for transforming onion cultivars planted in Mexico.

Key words: Onion, embryogenic callus, tissue culture, cotransformation.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por darme fortaleza a pesar de los obstáculos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

Por el apoyo económico para la realización de la presente investigación

Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología

Por su apoyo económico para la realización de la tesis
(Becas-Tesis promoción 2004)

Consejo Particular

Por su apoyo durante el desarrollo del proyecto de investigación

Profesores

Por el conocimiento y experiencia que me transmitieron durante el tiempo que duro mi preparación

DEDICATORIA

A MI ESPOSO

Por tu amor y por estar siempre a mi lado en todo momento, motivos que me han permitido alcanzar este sueño, eres una ángel que dios puso en mi vida.
TE AMO BLAS

RAYMUNDO

Por darme la experiencia de ser madre y porque deseo que triunfes en tu vida profesional y personal. Hijo quiero decirte que gracias por tu sacrificio, que me permitió culminar esta etapa de mi vida. Te quiero

MONSERRATH

Tu llegada a mi vida fue una experiencia maravillosa yo se que el tiempo que no pude darte, No lo recuperare jamás pero espero comprendas que fue por el amor que te tengo y deseo se convierta en triunfos en tu vida profesional y personal

CONTENIDO

	Página
INDICE DE CUADROS.....	x
INDICE DE FIGURAS.....	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1. Planteamiento del problema.....	1
2. Objetivos.....	2
3. Hipótesis.....	2
4. Revisión de literatura.....	3
4.1. Taxonomía y descripción de la planta de cebolla.	3
4.2. Generalidades del cultivo.....	3
4.2.1. Variedades cultivadas en México.....	4
4.2.2. Enfermedades y plagas.....	5
4.2.3. Fitomejoramiento.....	6
4.3. Morfogénesis <i>in Vitro</i>	6
4.3.1. Organogénesis.....	6
4.3.2. Embriogénesis somática.....	7
4.3.3. Cultivo de tejidos en cebolla.....	10
4.4. Transformación genética de plantas.....	11
4.4.1 Transformación genética mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	11
4.4.2 Modelos de la transferencia del T-ADN.....	14
4.4.3 Mecanismo de integración del T-ADN.....	15

4.4.4 Vectores.....	15
4.4.5 Tratamientos que incrementan la eficiencia de transformación por <i>Agrobacterium</i>	16
4.4.6 Agrolística.....	17
4.5 Métodos de transferencia directa.....	18
4.5.1 Transformación genética empleando biobalística.....	18
4.5.2 Tratamientos que incrementan la eficiencia de transformación.....	19
4.5.3 Transformación mediante electroporación.....	20
4.5.4 Transformación mediante polietilenglicol (PEG).....	20
4.5.5 Transformación mediante microinyección.....	21
4.5.6 Transformación mediante fibras de silicón.....	21
4.5.7 Genes marcadores.....	22
4.5.8 Genes reporteros.....	23
4.6. Mecanismos de integración del ADN empleando biobalística.....	24
4.7. Transformación genética en <i>Allium cepa</i>	24
5. Literatura citada.....	27
CAPITULO I REGENERACIÓN <i>in vitro</i> DE PLANTAS DE CEBOLLA (<i>Allium Cepa</i> L.).....	37
1.1 Resumen	37
1.2 Abstract	38
1.3 Introducción.....	39

1.4 Materiales y métodos.....	40
1.5 Resultados y discusión.....	43
1.6. Conclusiones.....	50
1.7. Literatura citada.....	51
CAPITULO II TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CEBOLLA (<i>Allium cepa</i> L.) MEDIANTE BIOBALÍSTICA.....	54
2.1. Resumen	54
2.2. Abstract	55
2.3. Introducción.....	55
2.4. Materiales y métodos.....	57
2.5. Resultados y discusión.....	61
2.6. Conclusiones.....	69
2.7. Literatura citada.....	70
2.10. Anexo.....	76
6. CONCLUSIONES GENERALES.....	81

INDICE DE CUADROS

	Página
CAPITULO I	
Cuadro 1.1. Cuadrados medios para las variables porcentaje de explantes con plantas y número promedio de plantas por explante.....	44
Cuadro 1.2. Promedios de explantes con plantas y plantas formadas por explante inducidos en variedades de cebolla crecidos en diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento....	45
CAPITULO II	
Cuadro 2.1. Número de clonas recuperadas a partir de callos transgénicos de la variedad Cristal bombardeados con distintos plásmidos.....	63

INDICE DE FIGURAS

	Página
CAPITULO I	
Figura 1.1. Regeneración <i>in vitro</i> de plantas de cebolla (<i>Allium cepa</i> L.). A: ápices de raíz después de cuatro semanas en el medio de inducción (2,4-D, 0.5 mg L ⁻¹). B: callo embriogénico después de ocho semanas de cultivo en un medio con 0.5 mg L ⁻¹ de 2, 4-D . C: plantas regeneradas después de 16 semanas de iniciar el cultivo. D: formación de microbulbos en las plantas regeneradas <i>in vitro</i> . E: bulbo después de 12 semanas de estar creciendo en invernadero. F: plantas obtenidas a partir de bulbos obtenidos en el invernadero.....	47
CAPITULO II	
Figura 2.1. A. Expresión transitoria del gen <i>gusA</i> en los callos bombardeados después de 48 horas; B. Callo transgénico (clonas) después de 6 meses del bombardeo (flecha); C. Planta regenerada a partir de callos transgénicos después de 1 año 6 meses del bombardeo; D. Regeneración de plantas transgénicas en medios suplementados con BA y AIA.....	65
Figura 2.2. Amplificación PCR para detectar el gen <i>hph</i> en las células bombardeadas. Carril 1, marcador de peso molecular. Carriles 2, 3, 4 y 5, DNA de callos de cebolla bombardeados con los plásmidos pWRG1515/pRDTAS, pWRG1515/pODC, pWRG1515/pODC y pWRG1515/pRDTAS, respectivamente. Carriles 6 y 7, DNA de callos de cebolla no bombardeados. Carril 8, DNA de papaya transformada con el plásmido pWRG1515 (control positivo).	68
Figura 2.3. Amplificación PCR para detectar el gen <i>gusA</i> en los callos bombardeados. Carril 1, marcador de peso molecular. Carril 2, control positivo (secuencia del gen <i>gus</i> de 420 pb). Carriles 3 al 8, DNA de callos de cebolla bombardeados con los plásmidos: p1515/pRDTAS (3, 4); pWRG1515/pODC (5, 6); pWRG1515/pRDTAS (7, 8). Carril 9, control negativo (agua destilada).....	69

INTRODUCCIÓN GENERAL

La cebolla (*Allium cepa* L.) ha formado parte de la dieta humana desde tiempos muy remotos y su uso data del año 3200 a. C. Esta hortaliza fue cultivada por los egipcios, griegos y romanos siendo preferida y apreciada por sus cualidades curativas y afrodisiacas.

La cebolla se siembra en gran parte del mundo, actualmente la superficie sembrada asciende a más de 2 millones de hectáreas, ubicándola como la segunda hortaliza que se produce a nivel mundial después del jitomate (*Lycopersicon esculentum* L.) (SAGARPA, 2008).

En México la cebolla se cultiva en 26 estados del territorio nacional, con rendimiento de 26.7 t ha⁻¹ en 2008 (SAGARPA, 2008) y es el principal exportador de esta hortaliza a los Estados Unidos.

1. Planteamiento del problema

Entre los problemas que presenta el cultivo de la cebolla, está la incidencia de plagas; los trips (*Thrips tabaci* Linderman) y el minador de la hoja (*Liriomyza* spp.), y enfermedades mancha púrpura (*Alternaria purri* Ell.), mildiú veloso (*Peronospora destructor* Berck.), ocasionalmente botrytis (*Botrytis* spp.) y pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berck.), esta última es la más distribuida y causa pérdidas considerables (Fritsch y Friesen, 2002) además de dejar el suelo imposibilitado para sembrar cebolla por cinco años o más por la permanencia de esclerocios.

Por otra parte, la corta viabilidad de su semilla y la falta de métodos adecuados para producir semilla mejorada (Hernández-Livera *et al.*, 1999), su hábito bianual

(Hanelt, 1990), esterilidad y pobre fertilidad de los híbridos interespecíficos (Kik, 2002), son otras desventajas que presenta este cultivo. Asimismo, los métodos y técnicas de mejoramiento aplicadas necesitan por lo menos cinco años de selección para producir plantas uniformes. Un híbrido en un programa de mejoramiento de cebolla no se puede liberar antes de 15-20 años (Pérez *et al.*, 1997).

Lo anterior obliga a buscar sistemas alternativos para la producción de semilla, y mejoramiento de éste cultivo, uno de los cuales es la ingeniería genética, mediante la cual se le puedan incorporar a la planta de cebolla genes que permitan obtener variedades con nuevas características. Aún cuando la producción de plantas transformadas puede ser una buena alternativa en un programa de mejoramiento genético, los estudios realizados con este enfoque son escasos para el cultivo de cebolla, por lo que la presente investigación tuvo como objetivos:

2. Objetivos

Establecer un sistema eficiente de regeneración de cebolla *in vitro*.

Desarrollar un protocolo de transformación genética de cebolla mediante biobalística.

3. Hipótesis

El establecimiento de un sistema eficiente de regeneración permitirá obtener con éxito plantas de cebolla genéticamente modificadas.

4. Revisión de literatura

4.1. Taxonomía y descripción de la planta de cebolla

La cebolla es una planta monocotiledónea, la clasificación más reciente la ubica en el Superorden *Liliana*, Orden *Amaryllidales*, Familia *Alliaceae*, Género *Allium* y Especie *Allium cepa* L. Asia es considerada como su centro de origen, lugar de donde se diseminó a Europa y África del Norte, actualmente se distribuye en todos los continentes (Hanelt, 1990).

La cebolla es una planta herbácea que produce un bulbo subterráneo el cual está formado por hojas gruesas y modificadas (catáfilas) con función de almacenamiento de agua y nutrientes para el crecimiento de las yemas y del tallo (Hanelt, 1990; Pérez *et al.*, 1997). La raíz verdadera muere temprano y las raíces adventicias son fasciculadas y de origen caulógeno y nacen del tallo en la base de las vainas de las hojas. El tallo es hipogeo, erecto, de consistencia herbácea con duración anual y esta ubicado en la base del bulbo, consta de un disco o plato con diámetro de 1.5 a 2.0 cm; sobre él se forman las yemas y las hojas, además de las raíces adventicias. La semilla es de 3 mm de diámetro aproximadamente. El embrión es curvado con un cotiledón cilíndrico y radícula muy corta (Brewster, 1990; Hanelt, 1990; Pérez *et al.*, 1997).

4.2. Generalidades del cultivo.

La cebolla es una hortaliza de clima frío o templado, llega a tolerar temperaturas hasta de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ en etapa adulta, prefiere suelos sueltos, sanos, profundos y ricos en

materia orgánica. Es ligeramente tolerante a la acidez (pH 6.8-6.0) y medianamente tolerante a la salinidad (Hanelt 1990; Pérez *et al.*, 1997).

El ciclo de cultivo de esta planta puede ser anual y bianual (Pérez *et al.*, 1997) y es propagada por semilla o por bulbos. El trasplante es el método de siembra más común, donde se establece la semilla en almácigos (1.5 a 2.0 kg/ha) hasta que las plantas alcanzan 20 cm (de 1.5 a 2.0 meses aproximadamente), el trasplante al lugar definitivo se realiza cuando los bulbos tienen un diámetro de 6 a 7 mm. En México la siembra directa es la más utilizada debido a las condiciones de temporal en las regiones donde se cultiva; sin embargo, para el cultivo de cebolla destinado a exportación, el sistema de trasplante es el más recomendable. Hay tres épocas de siembra; a) con clima frío (octubre-enero); b) cálido (junio) y c) templado (abril-junio). En nuestro país el cultivo se realiza en dos ciclos agrícolas, siendo el de Otoño-Invierno el más importante, con 60 % de la producción total. La densidad de población puede ser de 138 000 a 260 000 plantas por hectárea con densidad de siembra de 4 a 6 kg/ha (Hanelt 1990; Pérez *et al.*, 1997).

El bulbo de esta hortaliza presenta una amplia variación en sus características; su forma puede ser desde ovalada, o ligeramente aplanada hasta globosa. Su piel puede variar desde el blanco, amarillo, bronce, rojo, púrpura y violeta; hay también variación en sabor y grado de pungencia (Fritsch y Friesen, 2002).

4.2.1. Variedades cultivadas en México

En México las variedades más utilizadas son: cebolla blanca; White Lisboa, Early Supreme, Grandex 33, Cristal Wax, Cojumatlán, Astro, etc. Cebolla amarilla;

Primavera, Chula Vista, Grandex Yellow, Sentinel entre otras. Cebolla roja; Cristal Wax, Fuego, Mercury etc. Cebollines; Eclipse, Española dulce, Blanca de Lisboa y White Globe. (Robles, 2000). Cabe mencionar que los agricultores prefieren la semilla de importación la cual se cotiza en 200 dolares por kilogramo mientras que la nacional anda alrededor de los 6 dolares por kilogramo, lo que les permite asegurar un rendimiento entre 20 y 50 t/ha, por el contrario el uso de semilla nacional produce rendimientos entre 10 y 20 t/ha.

4.2.2. Enfermedades y plagas

El cultivo de la cebolla enfrenta la incidencia de plagas como los trips (*Thrips tabaci* Linderman) y el minador de la hoja (*Liriomyza* spp.) y enfermedades como la mancha púrpura (*Alternaria purri* Ell.), el mildiú veloso (*Peronospora destructor* Berck.) y botrytis (*Botrytis* spp.) que se presentan en el follaje y la pudrición blanca causada por el hongo *Sclerotium cepivorum* Berk (Colman *et al.*, 1998).

La pudrición blanca es uno de los problemas más graves que limitan la producción de cebolla en nuestro país desde su introducción en los años setentas, ya que llega a causar pérdidas del 100 %, a tal grado, que los productores abandonan la tierra por falta de estrategias de manejo adecuadas. Se han desarrollado diferentes medidas de control para esta enfermedad como son el control físico que consiste de solarización o inundación del campo de cultivo; el control químico con la aplicación de fungicidas selectivos, fumigantes y compuestos como el bicloruro de mercurio y el bromuro de metilo, este último destructor de la capa de ozono (Colman *et al.*, 1998), pero su alto costo económico y ecológico los hacen imprácticos. También se ha

intentado el control biológico, sin éxito, con antagonistas y micorrizas. Otra medida de control es el uso de cultivos que producen isotiosanatos (brassicaceas), conocidos como biofumigantes (Villar *et al.*, 1990; Zavaleta *et al.*, 1992), cuyos residuos en colaboración con microorganismos del suelo contribuyen al control de patógenos como hongos y nemátodos. Por último la aplicación de compuestos como el sulfuro de alilo y n-propilo, que estimulan la germinación del inóculo, que al igual que el control físico y químico resulta impráctica (Crowe *et al.*, 1994).

4.2.3. Fitomejoramiento

La cebolla es una planta alógama cuyo número cromosómico es de $2n=16$ ($n=8$). La autopolinización es difícil, ya que las anteras maduran antes que sus pistilos (protandria) (Kik, 2002).

En programas de mejoramiento genético la hibridación ha sido una herramienta importante para la introducción de variación genética. En caso de la cebolla el mejoramiento por esta vía ha presentado pocos avances, debido a barreras interespecíficas como son desordenes en el tubo polínico, limitada recombinación entre genomas, e insignificante producción de semillas. Otro inconveniente que se presenta con el mejoramiento genético tradicional es el factor tiempo ya que para obtener plantas uniformes se necesitan por lo menos 5 años de selección (Pérez *et al.*, 1997) y representa una tarea difícil.

4.3. Morfogénesis *in vitro*

4.3.1. Organogénesis.

La formación de órganos (vástago o raíz) *de novo* u organogénesis es la respuesta de un órgano o tejido cuando es crecido en medio de cultivo de donde es

posible la formación directa de yemas que den lugar a tallos (organogénesis directa), o bien indirecta en donde éste se genera de una masa amorfa de tejido denominado callo (organogénesis indirecta). La respuesta morfogénica depende de varios factores como son: las condiciones de crecimiento de la planta madre, genotipo, estado ontogénico del explante, medio de cultivo, combinación y niveles de reguladores del crecimiento y las condiciones físicas de incubación (luz, temperatura, humedad) (Novák, 1990).

Dado que este método mantiene estabilidad genética, puede ser usado para la conservación *in vitro* de germoplasma (Novák, 1990). Asimismo, esta técnica permite la erradicación de virus de plantas infectadas, es posible producir una gran cantidad de plantas a partir de una fracción de tejido, posibilita el rescate de plantas en vías de extinción y facilita el manejo de especies con problemas de propagación; además, el contar con un sistema eficiente de regeneración de plantas facilita el desarrollo de protocolos de transformación genética.

4.3.2. Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es el proceso por el cual se desarrolla una estructura bipolar (semejante al embrión cigótico) a partir de una célula no cigótica (Von Arnold *et al.*, 2002). Esto se fundamenta en el hecho de que las células son totipotentes, por lo que poseen la capacidad potencial de formar un nuevo individuo (Salisbury y Ross, 1994).

La embriogénesis somática se da en forma directa a partir de células predeterminadas para el desarrollo embriogénico las cuales sólo requieren de

condiciones favorables para expresarse (Sharp *et al.*, 1980) o bien de forma indirecta, la cual requiere una desdiferenciación celular, proliferación de callo e inducción del estado embriogénico. Tanto la embriogénesis cigótica como la somática incluyen dos etapas: I) la embriogénesis propiamente dicha y II) la maduración del embrión. Durante la primera etapa, llamada embriogénesis, se pueden distinguir tres eventos, 1) división celular asimétrica, dando lugar a una célula apical pequeña y una basal grande, 2) formación del embrión globular y 3) transición al estado cotiledonar que coincide con la iniciación del primordio de raíz y en dicotiledóneas del primordio de tallo, aunque, la embriogénesis somática presenta obvias diferencias: falta de endospermo y suspensor, deshidratación y latencia del embrión (Fehér *et al.*, 2003)

En el esquema general de la embriogénesis somática ocurre un cambio en el programa común de expresión genética del tejido del explante por un nuevo patrón de expresión de genes embriogénicos, en donde las auxinas juegan un papel regulador muy importante (Fehér *et al.*, 2003). Se sabe que la presencia de auxina exógena en el cultivo *in vitro* estimula un incremento endógeno de la auxina endógena AIA (ácido indol acético), esta respuesta ha sido observada en cultivos como zanahoria, alfalfa y girasol (Pasternak *et al.*, 2002; Charrière *et al.*, 1999). Los niveles elevados de la auxina endógena han asociado con la inducción e incremento de la respuesta embriogénica. Un estudio de localización inmunocitoquímica antes, durante y después de la inducción de la embriogénesis somática, reveló que la de auxina puede ser una de las primeras señales que dirigen la embriogénesis somática (Thomas *et al.*, 2002).

Actualmente, se reconoce que las auxinas cambian la permeabilidad del plasmalema originando gradientes de pH entre la fase externa de la membrana y la

matriz de la pared celular (Pasternak *et al.*, 2002); además, participan en la inducción de genes que están relacionados con respuestas al estrés, los cuales participan como activadores de la embriogénesis. Fehér *et al.* (2003) afirman que el nivel hormonal endógeno, más que el estrés, es el principal factor que determina la respuesta embriogénica.

Dentro de los procesos que se activan durante la embriogénesis somática están la división celular, la desdiferenciación y subsiguiente embriogénesis, los cuales están asociados con cambios complejos en el patrón de proteínas, ya que muchas de ellas presentes en la célula diferenciada son inhibidas, mientras que otras son activadas (Gray *et al.*, 2001). La vía proteosoma-ubiquitina es la responsable de la degradación de la mayoría de las proteínas de la célula. Durante la desdiferenciación de células de tabaco se observó un marcado incremento en la expresión del gen de la ubiquitina. La presencia de este péptido puede estar relacionado con la destrucción selectiva de proteínas asociadas con el estado diferenciado previo.

La transición del estado celular somático al estado celular embriogénico es un evento muy complejo que involucra procesos como desdiferenciación, reactivación de la división celular y del metabolismo, así como cambios en el programa celular del desarrollo; estos procesos pueden ser correlacionados con ciertas características morfológicas de la célula como son células pequeñas, esféricas y ricas en citoplasma. En un estudio realizado en células de zanahoria con estas características se pudo observar que el 90 % podía iniciar la formación de embriones (Fehér *et al.*, 2003).

4.3.3. Cultivo de tejidos en cebolla

La regeneración de plantas vía cultivo de tejidos de la planta de cebolla se logró por primera vez al usar explantes de disco basal, bulbo, raíces de plántulas, semillas y flores (Hussey, 1978) en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) suplementado con el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y la 6-bencilaminopurina (BA); asimismo, la organogénesis tuvo lugar cuando el explante floral fue cultivado en presencia de citocininas (BA) (0.4-44 μM) y el ácido naftalenacético (ANA) (0.5-5 μM) (Dunstan y Short 1978). Van der Valk *et al.* (1992) lograron obtener alta frecuencia de embriogénesis somática a partir de embriones maduros y regeneración de plantas del cultivar Nostar 1. Años más tarde, Rodríguez *et al.* (1997) usaron como explante el disco basal y yemas cultivadas en presencia de BA y ANA (2 y 1 mg L^{-1} respectivamente), obtuvieron 6.5 plantas por explante.

Por otro lado, Saker (1997) estableció un protocolo de regeneración cebolla a través de embriogénesis somática repetitiva, partiendo de callos embriogénicos derivados de embriones cultivados en medio MS suplementado con 9.0 mg L^{-1} de 2,4-D. Las plantas regeneradas a partir de estos embriones fueron transferidas exitosamente al suelo. Eady y Lister (1998) utilizaron embriones inmaduros de tres cultivares, encontraron respuesta diferencial en la regeneración de plantas con respecto al genotipo. También Zheng *et al.* (1998) y Tanikawa *et al.* (1998) estudiaron los factores que influyen en la inducción propagación y regeneración de *Allium cepa*, llegaron a la conclusión de que la regeneración depende del cultivar.

Las hojas primarias han resultado ser un buen explante para la formación de callo y la regeneración de plantas cuando se cultivan en presencia de 2,4-D (1.0 mg L^{-1}

¹), cinetina (0.5 mg L^{-1}) y BA (2 mg L^{-1}) (Hegazi, 1999). Recientemente, la regeneración de cebolla fue obtenida de cultivos de flor y ovario en presencia de 2,4-D (2 mg L^{-1}) con 3.45 % de eficiencia (Kamstaityte y Stanys, 2002).

4.4. Transformación genética de plantas

Los métodos de transferencia de genes pueden ser de dos clases: 1) sistemas de transformación indirecta y 2) sistemas de transformación directa.

La transferencia indirecta mediante la bacteria *Agrobacterium* es la más usada aprovechando la habilidad natural de la bacteria para actuar como un ingeniero genético. El bombardeo de microproyectiles con ADN o biobalística es el segundo método empleado. Otros métodos de transferencia directa que se han desarrollado son la electroporación, tratamientos con polietilenglicol (PEG), microinyección y el uso de microfibras (Sharma *et al.*, 2005).

Para la obtención de plantas transgénicas los principales elementos a considerar son: a) tener un sistema eficiente de regeneración, b) una construcción genética, c) un sistema de transformación eficiente, d) recobrar y multiplicar plantas transgénicas, e) tener una expresión eficiente y estable del gen adquirido, f) lograr la transferencia de estos genes a cultivares elite por métodos convencionales y g) evaluar el comportamiento de estas plantas en condiciones de campo para demostrar su inocuidad (Sharma *et al.*, 2005).

4.4.1. Transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens es un fitopatógeno capaz de transformar células vegetales mediante la transferencia de genes causantes de la formación de tumores,

enfermedad conocida como agalla de la corona (Hooykaas y Schilperoort, 1992). Esta bacteria que habita en el suelo infecta a plantas dicotiledóneas principalmente, además de coníferas, y en menor grado monocotiledóneas.

A. tumefaciens tiene un plásmido Ti (inductor del tumor) de más de 200 kbp que incluye un segmento denominado T-ADN (región del plásmido Ti que se transfiere) que contiene dos tipos de genes, los genes oncogénicos, que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de auxinas (AIA) y citocininas (2-isopentil-AMP), responsables de la formación del tumor, y los genes que codifican para la síntesis de opinas, compuestos formados de un amino ácido y un azúcar y que son excretados por las células del tumor como fuente de carbono y nitrógeno para la bacteria. Las cepas de *A. tumefaciens* son clasificadas de acuerdo al tipo de opina que producen, así tenemos cepas del tipo nopalina, octopina, leucinopina y succinamopina. El T-ADN está flanqueado, además, por dos repetidos directos de 25 pares de bases, lo que permite transferir dicha secuencia de ADN localizada entre estos bordes (Hooykaas y Schilperoort, 1992).

El plásmido Ti contiene también los genes *vir* que participan en el proceso de transferencia del T-ADN. Esta región *vir* de 30 a 40 kbp aproximadamente, involucra ocho operones (*virA-virH*), de los cuales seis son esenciales (*vir A*, *vir B*, *vir C*, *vir D*, *vir E*, *vir G*) y dos no esenciales (*vir F*, *vir H*) (Hooykaas y Schilperoort, 1992; De la Riva *et al.*, 1998).

El proceso de transferencia se inicia cuando VirA, que es una proteína sensora, detecta la molécula señal (compuestos fenólicos como la acetosiringona) liberada por las células de planta que ha sufrido una herida, aunado a estos compuestos, pH ácido

y la presencia de cierta clase de monosacáridos (glucosa y galactosa) permiten la activación de la proteína VirA, estos carbohidratos amplifican la respuesta del sistema para responder a bajos niveles de compuestos fenólicos. Una vez activada, la proteína VirA transfiere su fosfato a la proteína VirG, la cual funciona como un factor transcripcional regulando la expresión de los genes *vir*. Entonces las proteínas VirD1 y VirD2 (endonucleasas) reconocen las secuencias borde y cortan, marcando el sitio de inicio y terminación de la cadena de T-ADN. La proteína VirD2 se une covalentemente al extremo 5' terminal formando un complejo proteína-T-ADN, esta asociación evita el ataque de exonucleasas a la vez que distingue el extremo líder de la cadena, ésta molécula inicia la importación del complejo T-ADN a la célula huésped, ya que dicha proteína posee una región señal de localización nuclear (NLS) que la capacita para entrar al núcleo (Citovsky *et al.*, 2007). La proteína VirC1 juega un papel como amplificador, ya que una delección del operón *virC* atenúa la virulencia de la cepa de *Agrobacterium*. La proteína VirD1 es esencial para el desdoblamiento de la cadena sustrato para VirD2 y otra proteína requerida para el transporte de la cadena T-ADN es VirD4, proteína transmembrana que se localiza predominantemente en el sitio citoplásmico de la membrana y su unión al complejo es dependiente de ATP, ayudando a su translocación (De la Riva *et al.*, 1998; Zupan *et al.*, 2000).

El complejo VirB integrado por 12 proteínas es un sistema de secreción tipo IV (T4SS) encargadas de ensamblar el canal de conjugación transcelular (T pilus) que involucra ambas membranas y que incluye desde la proteína VirB1 a la proteína VirB11, además de VirD4, VirE2, VirE3 y VirF, las cuales son fundamentales para la transferencia del VirD2-T-ADN (McCullen y Binns, 2006). El operon *virH* codifica para

las proteínas VirH1 y VirH2 cuya participación no es esencial pero pueden incrementar la eficiencia de la transferencia (De la Riva *et al.*, 1998; Zupan *et al.*, 2000; Citovsky *et al.*, 2007).

Una vez que el complejo T-ADN está dentro del núcleo interaccionan proteínas kinasas que activan kinasas dependientes de ciclinas (CAK2M) y proteínas unidas a la caja TATA (TBP) con la proteína VirD2 y la proteína VIP1 la cual se une a VirE2 y un grupo de histonas que se unen a VIP1 que al parecer funcionan como cromatina blanco para el complejo-T-ADN. La proteína CAK2M se une a la RNA-polimerasa II para dirigir y controlar la transcripción de la cadena de ADN complementaria. En tanto es necesaria la exposición de la cadena T-ADN que se logra con la participación de la maquinaria de proteólisis de la célula huésped llamada SCF (ubiquitinas ligasas) que identifican a VIP1 y la desestabilizan y consecuentemente a VirE2 que es la proteína más abundante del complejo T-ADN, que puede representar el mecanismo para exponer la cadena T y permitir que la maquinaria de reparación de ADN de la célula huésped forme la cadena complementaria y la integre al genoma (McCullen y Binns, 2006; Citovsky *et al.*, 2007).

La transformación mediante *Agrobacterium* tiene fuertes ventajas, tales como integración estable del ADN foráneo al ADN genómico y un patrón de segregación simple por bajo número de copias (Sharma *et al.*, 2005).

4.4.2. Modelos de la transferencia del T-ADN

Se conocen dos modelos para la transferencia del complejo T-ADN. El más aceptado propone que el complejo T-ADN-VirD2 de cadena sencilla es cubierto por la

proteína VirE2, lo que previene el ataque de nucleasas y reduce el diámetro del complejo facilitando el paso por los canales de la membrana en la célula vegetal. La proteína VirE2 contiene dos señales de localización al núcleo de la planta y VirD2 una, lo que hace pensar que dichas proteínas juegan un papel importante en la conducción de la cadena T-ADN al núcleo de la célula vegetal (De la Riva *et al.*, 1998).

El otro modelo plantea que el complejo T-ADN-VirD2 se transfiere a la célula vegetal en forma independiente de la proteína VirE2 y una vez dentro de la célula de la planta el complejo es cubierto por la proteína VirE2. Evidencia al respecto indica que la proteína VirE1 es esencial para la exportación de VirE2, ya que mutantes en *virE1*, no pueden exportar VirE2, la cual se acumula en la bacteria (Sundberg *et al.*, 1996).

Asimismo, la transferencia de T-ADN también está mediada por los genes *chvA*, *chvB* y *pcsA*, que participan en la unión de *Agrobacterium* a las células vegetales durante el proceso de infección (Hooykaas y Schilperoort, 1992).

4.4.3. Mecanismo de integración del T-ADN

La integración del T-ADN al genoma de la planta es la culminación del proceso de transformación, se sugiere que ocurre vía recombinación ilegítima; es decir, que sólo pocas bases presentan homología (microhomologías), este apareamiento en unas cuantas bases es suficiente para el prealineamiento entre el complejo-T-ADN y el ADN de la planta, como resultado de este contacto se forma una unión 3'-5' y subsecuentemente la cadena de ADN de la planta es cortada en la posición 3' y substituida, e inmediatamente el extremo 5' es atacado por VirD2 y el otro extremo del complejo (3') se une en el corte de la cadena fundamental de ADN de la planta. Una

vez que la introducción de la cadena T-ADN al ADN de la planta ha terminado se activan los mecanismos de reparación de la célula vegetal y la cadena complementaria es sintetizada usando como molde la cadena T-ADN insertada (Tinland *et al.*, 1995; Chilton y Que, 2003).

4.4.4. Vectores

Para insertar los genes de interés en el T-ADN se emplean vectores intermediarios y se hace por recombinación homóloga, éstos genes pueden localizarse con la región *vir* en el mismo plásmido, entonces se dice que son vectores cointegrados o bien, se encuentran en plásmidos diferentes aprovechando la capacidad de la región *vir* para actuar en *trans* y son llamados vectores binarios; así, el plásmido Ti proporciona la función *vir* y el plásmido de clonación provee el T-ADN (Weising *et al.*, 1988). Un requerimiento importante en este sistema de transferencia de genes es la presencia de algunos compuestos activos como la acetosiringona, que juega un papel importante en la inducción de los genes *vir*.

4.4.5. Tratamientos que incrementan la eficiencia de transformación por *Agrobacterium*

Para incrementar la eficiencia de transformación se ha recurrido al empleo de diferentes tratamientos; por ejemplo, la aplicación de ultrasonido sobre el explante por breves periodos en presencia de *Agrobacterium*, lo cual produce heridas pequeñas y uniformes, que facilitan el acceso de la bacteria, esto se conoce como transformación mediante *Agrobacterium* asistida por sonicación (SAAT) (Sharma *et al.*, 2005). Otro tratamiento es el método de la punta floral, que consiste en la aplicación directa de *Agrobacterium* al tejido floral (Sharma *et al.*, 2005).

El método de secado del tejido con el aire de una campana de flujo laminar, previo y durante el cocultivo con la bacteria, fue aplicado por Cheng *et al.* (2003) e incrementó con ello la eficiencia de transformación estable en trigo. Estos autores mencionan que el efecto positivo de dicho tratamiento se debe a que suprime el crecimiento de la bacteria y favorece la recuperación de células transformadas. Por su parte, Grajales (2005) explica que el secado del tejido previo al bombardeo de micropartículas causa cambios estructurales en la membrana plasmática alterando su permeabilidad, evitando así la muerte masiva de las células por entallamiento provocado por el impacto de los microproyectiles sobre éstas.

El tratamiento osmótico también ha mostrado tener efecto en la eficiencia de transformación. En un estudio realizado con arroz, la transferencia de genes se incrementó en 14 % al usar 10 % de sacarosa en el medio de cocultivo (Uzé *et al.*, 1997). Resultados similares fueron reportados en trigo, sorgo y maíz (Uzé *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2000; Frame *et al.*, 2002).

4.4.6. Agrolística

Es una técnica que combina las ventajas de la entrega eficiente mediante biobalística y la precisión de los mecanismos de inserción del T-ADN por *Agrobacterium*. Estas características combinadas permiten registrar inserciones predecibles en las plantas que normalmente no son transformadas por *Agrobacterium*. Además, es posible la integración del gen de interés sin las secuencias indeseables del vector (Sharma *et al.*, 2005).

4.5. Métodos de transferencia directa

4.5.1. Transformación genética empleando biobalística

El bombardeo de partículas se desarrolló en los 1980s como un método alternativo para la transformación genética de plantas recalcitrantes a la transformación mediante *Agrobacterium*, en su mayoría cereales y leguminosas (Taylor y Fauquet, 2002).

Esta tecnología involucra partículas metálicas microscópicas (0.4 a 2.0 μm de diámetro) de oro o tungsteno cubiertas con el material genético y que son impulsadas a alta velocidad sobre un tejido blanco para permitir que dicho material sea liberado en el interior de la célula. Estas partículas son aceleradas mediante macroacarreadores de polietileno o de nylon (cilíndricos o de disco), que a su vez, son impulsadas por la onda de choque causada por un gas (helio el más usado) a alta presión. Entonces, en una cámara bajo un vacío parcial, lo que evita la desaceleración de los microacarreadores como consecuencia de la fricción con el aire, son colocados los tejidos; al momento del bombardeo, el gas se deja pasar a una presión dada por una membrana (membrana de ruptura) que al romperse impulsa las partículas cubiertas con el ADN hacia los tejidos blanco, quedando la membrana retenida por una malla. El impacto de las partículas sobre el tejido presenta un patrón circular de uno a varios centímetros dependiendo de la distancia a la que se coloca el tejido blanco (Taylor y Fauquet, 2002).

Los primeros ensayos se limitaron a la expresión transitoria de genes marcadores, realizándose con células de catáfilo de cebolla, las cuales, permanecieron viables y mostraron la expresión del ácido nucleico foráneo, otros cultivos empleados fueron maíz, soya, trigo y arroz (Klein *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1988). El primer sistema

para impulsar los microproyectiles fue desarrollado por Sanford *et al.* (1991), siendo modificado posteriormente para dar lugar a la pistola PDS-1000/He (Russell, 1993).

El éxito del bombardeo depende de varios factores como son el tipo de explante, tamaño de las micropartículas y su preparación, presión de bombardeo, distancia recorrida por el ADN, nivel de vacío generado, cantidad y calidad del ADN, así como parámetros biológicos como el estado fisiológico del explante, ya que el tejido blanco debe ser capaz de recibir e integrar el ADN foráneo, estar bajo selección para asegurar un evento transgénico exitoso y además regenerar y producir plantas fenotípicamente normales y fértiles.

El uso de la biobalística permite la transformación de especies recalcitrantes a la transformación mediante *Agrobacterium*, como las monocotiledóneas, sólo requiere de las secuencias de ADN de interés, se puede introducir más de un gen y más de un plásmido a la vez, se elimina la interacción planta-bacteria y es un método práctico (Sanford, 1990).

4.5.2. Tratamientos que incrementan la eficiencia de transformación

El tratamiento del tejido blanco antes y después del bombardeo ha tenido un efecto significativo en la frecuencia y éxito del evento de transformación (Taylor y Fauquet, 2002).

Se han usado agentes osmóticos como manitol o sorbitol, e incluso sacarosa, sometiendo el tejido varias horas antes y después del bombardeo. Se cree que el estrés osmótico previo causa una plasmólisis parcial en las células disminuye la presión en el interior, de esa forma, reduce o previene la muerte celular debido a la

expulsión de protoplasma a través de las heridas causadas en la célula por la entrada de las micropartículas (Sanford *et al.*, 1991).

En varios estudios, el tratamiento de las células blanco con agentes osmóticos previo al bombardeo incrementó la frecuencia y el éxito de la transformación (Kemper *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1998; Suga *et al.*, 2003).

4.5.3. Transformación mediante electroporación

La electroporación es un tratamiento de naturaleza física, consiste en someter a la célula a altos voltajes, lo que causa temporalmente la formación de poros en la membrana, se usa en protoplastos, células intactas y tejidos. Aunque la transformación genética por este método ha sido efectiva, la frecuencia es significativamente baja. Se ha podido lograr expresión transitoria con esta técnica en protoplastos y células intactas de remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.) (Lindsey y Jones, 1987) y transformación en protoplastos de arroz (*Oriza sativa*) (Shimamoto *et al.*, 1989) y en embriones de maíz (Songstad *et al.*, 1993).

Dentro de los factores que influyen en este sistema de transformación se pueden citar la intensidad del campo eléctrico, duración, número, intervalo entre impulsos, concentración de ADN, tipo de ADN, tipo de explante, entre otros (Sharma *et al.*, 2005).

4.5.4. Transformación mediante polietilenglicol (PEG)

El sistema PEG se usa en protoplastos, es un tratamiento químico, el cual provoca un cambio transitorio en la permeabilidad de la membrana facilitando la entrada de ADN exógeno. Se han podido regenerar plantas transgénicas de *Nicotiana*

tabacum (Paszkowski *et al.*, 1984), aunque la frecuencia de transformación obtenida fue menor al 1 %.

La eficiencia de éste sistema estriba en parámetros como el origen del explante, peso y concentración del PEG, estado de desarrollo del explante, etc. (Sharma *et al.*, 2005).

4.5.5. Transformación mediante microinyección

La tecnología de microinyección en el caso de células vegetales ha mostrado gran dificultad para la introducción de material genético, resultando incapaz de producir plantas transgénicas en número suficiente. Se usa una micropipeta con punta muy fina (0.5-10 μm) por donde el ADN es transferido al interior de la célula, la cual es inmovilizada por un soporte sólido. El alto costo del equipo, la manipulación de células simples o pequeñas cantidades de ellas, uso de microscopio, precisión en la inyección, son algunas de las limitantes para el uso extensivo de este método (Sharma *et al.*, 2005).

4.5.6. Transformación mediante fibras de silicio

Este sistema, recientemente desarrollado, consiste de microfibrillas de 10-80 μm de longitud y 0.6 μm de diámetro aproximadamente. Las fibras, las células y el ADN se mezclan en un medio líquido con la ayuda de un vortex, las fibras causan heridas a la célula por las cuales penetra el ADN y llega a integrarse al genoma. Plantas transgénicas de maíz y algunas monocotiledóneas han sido regeneradas por este sistema y a pesar de que es un método sencillo y barato no ha sido ampliamente usado

por el peligro potencial que implican las fibras para la salud humana (Taylor y Fauquet, 2002).

4.5.7. Genes marcadores

Los genes marcadores de selección sirven para distinguir las células transformadas de las no transformadas y son introducidos al genoma de las plantas en el proceso de transformación, éstos son integrados junto con el gen de interés, por lo que es posible monitorear su expresión. El propósito de estos genes es ofrecer una ventaja selectiva a las células transformadas mediante la expresión de una nueva característica que en condiciones normales no produce, lo que les permite crecer más rápido y mejor que las células no transformadas. Tales genes marcadores son genes que confieren resistencia a antibióticos, a herbicidas, a altas concentraciones de azúcares, etc., generalmente expresan una proteína con actividad enzimática (Brasileiro y Aragão, 2001).

Uno de los genes marcadores más comúnmente usados es el gen *npt II*, que confiere resistencia a los antibióticos aminoglicósidos como la kanamicina A, B y C, neomicina, paramomicina y geneticina, codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa II (NPT II), ésta fosforila al antibiótico y lo inactiva.

Otro de los genes marcadores es el gen *hpt* que confiere resistencia a higromicina, codifica para la enzima higromicina fosfotransferasa (HPT), la cual cataliza la fosforilación del antibiótico y lo inactiva (Brasileiro y Aragão, 2001).

Dentro de los genes que proporcionan resistencia a herbicidas están, *aro A*, que confiere resistencia al glifosato, el gen *bar* que confiere resistencia a la L-fosfinotricina, gen *als* que confiere resistencia a clorosulfuron, etc. (Brasileiro y Aragão, 2001).

Asimismo, los genes de selección positiva permiten la identificación y selección de células transformadas sin dañarlas, en este caso, las células transformadas adquieren la capacidad de metabolizar algunos compuestos que normalmente no metabolizan y en presencia de éstos, crecen normalmente, lo que no hacen las células no transformadas.

El gen *manA* es un marcador de selección positiva que codifica a la enzima fosfomanosa isomerasa (PMI) la cual cataliza la conversión de manosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato que es la forma de carbono asimilable en células normales. La acumulación de manosa-6-fosfato resulta tóxica para la célula de manera natural y causa deficiencia de fosfato y ATP, necesarios para las funciones vitales (Brasileiro y Aragão, 2001).

4.5.8. Genes reporteros

Los genes reporteros, como el gen *gusA*, el gen luciferasa y gen *gfp* permiten identificar visualmente a las células transformadas (Brasileiro y Aragão, 2001).

El gen reportero *gusA* (gen *uidA*) aislado de *Escherichia coli* es ampliamente usado en la transformación de plantas y codifica para la enzima β -glucuronidasa, en este sistema la enzima cataliza el rompimiento de una amplia variedad de glucurónidos. En presencia del sustrato X-gluc (5-bromo-4 cloro-3 indolil glucuronide) produce un

precipitado azul, lo que permite la localización espacial del gen (Brasileiro y Aragão, 2001).

El gen *gfp* codifica para la proteína verde fluorescente (GPF); es una molécula reportera usada para monitorear la expresión del gen en vivo y en tiempo real. La proteína GFP emite luz verde (λ -509 nm) cuando se excita con luz UV (λ -395 nm) (Kitts *et al.*, 1995).

El gen *luc* es un sistema marcador basado en la bioluminiscencia; las enzimas responsables de la producción de luz se llaman luciferasas, que emiten luz a una longitud de onda de 547 hasta 593 nm (Vázquez *et al.*, 1995).

4.6. Mecanismo de integración del ADN empleando biobalística

La integración del ADN foráneo al genoma de la planta se sugiere ocurre vía recombinación ilegítima. Este proceso de inserción se cree que ocurre en dos pasos; primero el ADN foráneo puede experimentar recombinaciones homologas y ligaciones previas a la inserción al genoma de la planta para crear rearrreglos del ADN introducido, que a su vez puede incluir fragmentos de plásmido y copias rotas del cassette de expresión. En la segunda fase los arreglos de ADN son insertados en el genoma de la planta. La integración involucra mecanismos de reparación del ADN nativo y recombinación no homologa en los sitios de ruptura de la doble cadena en el cromosoma de la planta (Tzfira *et al.*, 2003).

4.7. Transformación genética en *Allium cepa*

En 1990, Dommissé *et al.* demostraron que la planta de cebolla podía ser infectada por *A. tumefaciens* y formar tumores al ser inoculada en bulbos y hojas,

abriendo con ello la posibilidad de emplear esta bacteria para la transformación genética de este género. Más tarde, Eady (1995) perfiló el potencial para el desarrollo de un sistema de transformación para cebolla; hizo una compilación de estudios realizados en cultivo de tejidos, sistemas disponibles de transferencia de genes, secuencias regulatorias y genes selectivos con el propósito de proponer rutas posibles por las cuales la cebolla pudiera ser regenerada y transformada, así como problemas que pudieran surgir al usar tales técnicas. Finalmente concluyó que la transformación de la cebolla tomaría tiempo por ser un cultivo recalcitrante. Después, en 1996, el mismo autor y colaboradores estudiaron la expresión del gen *uidA*, después de infectar con *A. tumefaciens* y bombardear embriones inmaduros y microbulbos. Dichos experimentos resultaron exitosos en la transferencia de ADN foráneo y la expresión del gen *uidA*. En 2000, Eady *et al.* desarrollaron un método de transformación usando la cepa LBA4404 que contenía un vector binario con los genes *nptII* y *gfp5-ER*. Los explantes consistieron de embriones inmaduros del cultivar Canterbury Longkeeper, logrando una eficiencia de transformación de 2.7 %.

De la misma manera, Zheng *et al.* (2001) desarrollaron un protocolo de transformación en los cultivares Sturon y Hyton mediante *A. tumefaciens*. Las cepas empleadas fueron EHA105 (pCAMBIA 1301) y LBA4404 (pTOK233), que llevaban los genes de selección *nptII* y *hpt*, que confieren resistencia a kanamicina e higromicina respectivamente, además del gen reportero *uidA*. Los resultados obtenidos indicaron que la expresión del gen *uidA* fue mejor al infectar callos derivados de embriones maduros con la cepa LBA4404. Las plantas transformadas mostraron características

morfológicas normales en condiciones de invernadero; sin embargo, la eficiencia de transformación fue baja (cultivar Sturon de 0.15 % y Hyton 0.5 %).

Eady *et al.* (2003), obtuvieron plantas transgénicas de cebolla tolerantes a glifosato ó a fosfinotricina. Usaron embriones inmaduros y lograron solo el 0.9 % de transformación; además, demostraron que las plantas no mostraban daño al ser expuestas al doble de la dosis de herbicida recomendada en campo para la erradicación de malezas. Aunque la frecuencia de transformación fue muy baja, los autores afirman que el método de transformación aplicado en este estudio puede ser usado con diferentes agentes selectivos independientemente del cultivar.

La cebolla ha presentado algunas dificultades para su transformación; sin embargo, Zheng *et al.* (2005) desarrollaron shallots (*Allium cepa*) transgénicos de dos cultivares (Tropix y Kuning) que mostraron resistencia al insecto *Spodoptera exigua* Hübner con 3.68 % de frecuencia de transformación. Ellos emplearon un gen híbrido *cry1Ca* o *H04* de *Bacillus thuringiensis* cuyo promotor es la unidad pequeña de la ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa de crisantemo (RubiscoSSU) y que contenía el gen *htp*. De las plantas que sobrevivieron en condiciones de invernadero, 69% presentaba el gen *cry1Ca* y el 39% el gen *H04*; la integración del T-ADN al genoma de shallot se confirmó mediante análisis de PCR y Southern blot. La toxina de *H04* resultó más toxica a *S. exigua* que la toxina *cry1Ca*.

5. Literatura citada

- Brasileiro, A. C. M. and F. J. L. Aragão. 2001. Marker genes for *in vitro* selection of transgenic plants. *Journal of Plant Biotechnology* 3: 113-121.
- Brewster, J.L. 1990. Physiology of crop growth and bulbing. *In* : H.D. Rabinowitch and J.L. Brewster (eds.). *Onions and Allied Crops*. Vol 1. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. pp: 54-81.
- Charrière, F., B. Sotta, E. Miginiac and G. Hahne. 1999. Induction of adventitious or somatic embryos on *in vitro* cultured zygotic embryos of *Helianthus annuus*: variation of endogenous hormone levels. *Plant Physiology Biochemistry* 37: 751-757.
- Chen, L., S. Zhang, R. N. Beachy and C. M. Fauquet. 1998. A protocol for consistent, large-scale production of fertile transgenic rice plants. *Plant Cell Reports* 18: 25-31.
- Cheng, M., T. Hu, J. Layton, C. Liu and E. Fry. 2003. Desiccation of plant tissue post-*Agrobacterium* infection enhances T-DNA delivery and increases stable transformation efficiency in wheat. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 39: 595-604.
- Chilton, M. M. and Q. Que. 2003. Targeted integration of T-DNA into the tobacco genome at double-stranded breaks: new insights on the mechanism of T-DNA integration. *Plant Physiology* 133: 956-965.
- Citovsky, V., S. V. Kozlovsky, B. Lacroix, A. Zaltsman, M. Dafny-Yelin, S. Vyas, A. Tovkach and T. Tzfira. 2007. Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. *Cellular Microbiology* 9: 9-20.

- Colman, J. J., R. D. Blake and S. F. Rowland. 1998. Atmospheric residence time of CH₃Br estimated from the jungle spatial variability relation. *Science* 281: 392-398.
- Crowe, F. J., J. Debons, T. Darnell, M. Thornton, D. McGrath, P. Koepsell, C. J. A. Laborde and J. E. Redondo. 1994. Control of *Allium* white rot disease with DADS and related products. *In: Proceedings of the Fifth International Workshop on Allium White Rot*. A.R. Entwistle and J. M. Melero-Vara (eds.). Instituto de Agricultura Sostenible, Cordoba, Spain and Horticulture Research International, Warwick, UK. pp. 7–22.
- De la Riva, G. A., J. González-Cabrera, R. Vázquez-Padrón y C. Ayra-Pardo. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Electronic Journal of Biotechnology* 1: 118-133.
- Dommissé, E. M., D. W. M. Leung, M. L. Shaw and A. J. Conner. 1990. Onion is a monocotyledonous host for *Agrobacterium*. *Plant Science* 69: 249-257.
- Dunstan, D. I., and K. C. Short. 1978. Shoot production from onion callus tissue cultures. *Scientia Horticulturae* 9: 99-110.
- Eady, C. C. 1995. Towards the transformation of onions (*Allium cepa*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 23: 239-250.
- Eady, C. C., C. E. Lister, Y. Suo and D. Schaper. 1996. Transient expression of *uidA* constructs in *in vitro* onion (*Allium cepa* L.) cultures following particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated ADN delivery. *Plant Cell Reports* 15: 958-962.

- Eady, C.C. and C. E. Lister. 1998. A comparison of four selective agents for use with *Allium cepa* L. immature embryos and immature embryo-derived cultures. *Plant Cell Reports* 18: 117-121.
- Eady, C.C., R. J. Weld and C. E. Lister. 2000. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and transgenic-plant regeneration of onion (*Allium cepa* L.). *Plant Cell Reports* 19: 376-381.
- Eady, C.C., D. Sheree, J. Farrant, J. Reader and F. Kenel. 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and regeneration of herbicide resistant onion (*Allium cepa*) plants. *Annals of Applied Biology* 142: 213-217.
- Fehér, A., T. P. Pasternak and D. Dudits. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 201-228.
- Frame, B. R., H. Shou, R. K. Chikwamba, Z. Zhang, C. Xiang, T. M. Fonger, S. E. K. Pegg, B. Li, D. S. Nettleton, D. Pei and K. Wang. 2002. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. *Plant Physiology* 129: 13-22.
- Fritsch, R. M. and N. Friesen. 2002. Evolution, domestication and taxonomy. *In*: H.D. Rabinowitch and L. Currah (eds.). *Allium Crop Science: Recent Advances*. CABI Publishing. New York, USA. pp: 5-30.
- Grajales, M. M. O. 2005. Apuntes de Bioquímica Vegetal. Bases para su Aplicación Fisiológica. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 170 p.
- Gray, W. M., S. Kepinski, D. Rouse, O. Leyser and M. Estelle. 2001. Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414: 271-276.

- Hanelt, P. 1990. Taxonomy, evolution, and history. *In*: H. D. Rabinowitch, and J. L. Brewster (eds.). Onions and Allied Crops. Vol 1. CRC Press. Boca Raton. FL, USA. pp: 1-27.
- Hegazi, H. H. 1999. Genotypic differences in callus formation and shoot-forming capacity of some vegetable species. Arab Universities Journal of Agricultural Sciences 7: 507-520.
- Hernández-Livera, A., J. A. Estrada-Gómez, A. Juárez-De la Cruz y O. J. Ayala-Garay. 1999. Influencia de la fertilización y del ambiente de almacenamiento en calidad de semilla de cebolla. Revista Fitotecnia Mexicana 22: 87-97.
- Hooykaas, P. J. J. and R. A. Schilperoort. 1992. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. Plant Molecular Biology 19:15-38.
- Hussey, G. 1978. *In vitro* propagation of the onion *Allium cepa* by axillary and adventitious shoot proliferation, Scientia Horticulturae 9: 227-236.
- Kamstaityte, D. and V. Stanys. 2002. Pathways of onion regeneration via flower and ovary culture. Zemdirbyste, Mokslo Darbai 78: 245-250.
- Kemper, E. L., M. J. Da Silva and P. Arruda. 1996. Effect of microprojectile bombardment parameters and osmotic treatment on particle penetration and tissue damage in transiently transformed cultured immature maize (*Zea mays* L.) embryos. Plant Science 121: 85-93.
- Kik, C. 2002. Exploitation of wild relatives for the breeding of cultivated *Allium* species. *In*: H.D. Rabinowitch and L. Currah (eds.) *Allium* Crop Science: Recent Advances. CABI Publishing. New York, USA. pp: 81-100.

- Kitts, P., M. Adams, A. Kondepudi, D. Gallagher and S. Kain. 1995. Green fluorescent protein (GFP): a novel reporter for monitoring gene expression in living cells and organisms. *CLONTECHniques*. X(1): 1-3
- Klein, T. M., E. D. Wolf, T. Wu and J. C. Sanford. 1987. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into plant cells. *Nature* 327: 70-73.
- Lindsey, K. and M. G. K. Jones. 1987. Transient gene expression in electroporated protoplasts and intact cells of sugar beet. *Plant Molecular Biology* 10: 43-52.
- McCullen, C. A. and A. N. Binns. 2006. *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22: 101-127.
- Novák, F. J. 1990. *Allium* tissue culture. *In*: H.D. Rabinowitch and J.L. Brewster (eds.). Onions and Allied Crops. Vol 1. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. pp: 233-250.
- Pasternak, T., E. Prensén, F. Ayaydin, P. Miskolczi, G. Potrees, H. Asard, H. Van Onckelen, D. Dudits and A. Fehér. 2002. The role of auxin, pH and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cell of alfalfa (*Medicago sativa* L.) *Plant Physiol.* 129: 1808-1819.
- Paszkowski, J., R. D. Shillito, M. Saul, V. Mandák, T. Hohn, B Hohn and I. Potrykus. 1984. Direct gene transfer to plants. *EMBO Journal* 3: 2717-2722.
- Pérez G., M., F. Márquez S., A. Peña L. 1997. *Mejoramiento Genético de Hortalizas*. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 379 p.
- Robles, A. M. 2000. Cebolla. Una hortaliza con gran diversificación de mercados y su situación actual. *Claridades Agropecuarias*. ASERCA. Título 7639. 36 p

- Rodríguez, B. M., J. E. Pinto y C. M. Souza. 1997. *In vitro* propagation of onion (*Allium cepa* L.) from bulb tissues. *Ciencia y Agrotecnología* 21: 343-352.
- Russell, K. J. 1993. The biolistic PDS-1000/He device. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 221-226.
- SAGARPA. 2008. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México D.F. <http://www.sagarpa.siap.gob.mx>. (Verificado Noviembre, 2008).
- Saker, M. M. 1997. *In vitro* regeneration of onion through repetitive somatic embryogenesis. *Biología Plantarum* 40: 499-506.
- Salisbury, F. B. and C. W. Ross. 1994. *Fisiología Vegetal*. Grupo Editorial Iberoamérica. México, D. F. 320 p.
- Sanford, J. C. 1990. Biolistic plant transformation: a critical assessment. *Physiologia Plantarum* 79: 206-209.
- Sanford, J. C., M. J. DeVit, J. A. Russell, F. D. Smith, P. R. Harpending, M. K. Roy and S. A. Johnston. 1991. An improved, helium-driven biolistic device. *Technique* 3: 3-16.
- Sharma, K. K., P. Bhatnagar-Mathur and T. A. Thorpe. 2005. Genetic transformation technology: status and problems. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 41: 102-112.
- Sharp, W. R., M. R. Sondahl, L. S. Caldas and S. B. Maraffa. 1980. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. *Horticultural Review* 2: 268-310.
- Shimamoto, K., R. Terada, T. Izawa and H. Fujimoto. 1989. Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature* 338: 274-276.

- Songstad, D. D., F. G. Halaka, D. L. DeBoer, C. L. Armstrong, M. A. W. Hinchee, C. G. Ford-Santino, S. M. Brown, M. E. Fromm and R. B. Horsch. 1993. Transient expression of GUS and anthocyanin constructs in intact maize immature embryos following electroporation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33: 195-201.
- Suga, M., I. Kusanagi and T. Hatakeyama. 2003. High osmotic stress improves electrotransformation efficiency of fission yeast. *FEMS Microbiology Letters* 225: 235-239.
- Sundberg, C., L. Meek, K. Carroll, A. Das and W. Ream. 1996. VirE1 protein mediates export of the single stranded DNA binding protein VirE2 from *Agrobacterium tumefaciens* onto plant cell. *Journal of Bacteriology* 178: 1207-1212.
- Tanikawa, T., M. Takagi and M. Ichii. 1998. Varietal differences in plant regeneration from solid and suspension cultures in onion (*Allium cepa* L.). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 67: 856-861.
- Taylor, N. J. and C. M. Fauquet. 2002. Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. *DNA and Cell Biology* 2: 963-977.
- Thomas, C., R. Bronner, J. Molinier, E. Prinsen, H. Van Onckelen and G. Hahne. 2002. Immuno-cytochemical localization of indole-3-acetic acid during induction of somatic embryogenesis in cultured sunflower embryos. *Planta* 215: 577-583.
- Tinland, B., F. Schoumacher, V. Gloeckler, A. M. Bravo-Angel and B. Hohn. 1995. The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome. *EMBO Journal* 14: 3585-3595.

- Tzfira, T., L. R. Frankman, M. Vaidya and V. Citovsky. 2003. Site-specific integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-ADN via double-stranded intermediates. *Plant Physiology* 133: 1011-1023.
- Uzé, M., J. Wünn, J. Puonti-Kaerlas, I. Potrykus and C. Sautter. 1997. Plasmolysis of precultured immature embryos improves *Agrobacterium* mediated gene transfer to rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science* 130: 87-95.
- Uzé, M., I. Potrykus and C. Sautter. 2000. Factors influencing T-DNA transfer for *Agrobacterium* to precultured immature wheat embryos (*Triticum aestivum* L.). *Cereal Research Communications* 28: 17-23.
- Van der Valk P., O. E. Scholten, F. Verstappen, R. C. Jansen, and J. J. M. Dons. 1992. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo-derived callus cultures of three *Allium* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30: 181-191.
- Vázquez T., M.E., D. Mohamed y A. J. Palomares D. 1995. Utilización de genes eucarióticos de luciferasa en el marcado de microorganismos y en el análisis de la transferencia génica. *Microbiología y Parasitología*. Universidad de Sevilla. 61: 660-668.
- Villar L., C., E. Zavaleta M. y E. R. García. 1990. Efecto de la incorporación de residuos de crucíferas (Brassicaceae) sobre fitopatógenos del suelo. II Efecto de la incorporación de col y brócoli sobre la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) de la cebolla, en invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología* 8: 160-165.

- Von Arnold, S., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok and L. Filonova. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 233-249.
- Wang, Y. C., T. M. Klein, M. Fromm, J. Cao, J. C. Sanford and R. Wu. 1988. Transient expression of foreign genes in rice, wheat and soybean cells following particle bombardment. *Plant Molecular Biology* 11: 433-439.
- Weising, K., J. Schell and G. Kahl. 1988. Foreign genes in plants: transfer, structure, expression and applications. *Annual Review Genetics* 22: 421-477.
- Zavaleta M., E., Rojas M. R. I. y Villar, L. A. C. 1992. Efecto de la incorporación de residuos de crucíferas (Brassicaceae) sobre fitopatógenos del suelo. III. Efecto de los compuestos volátiles emanados de residuos de crucíferas sobre la germinación de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk. *Revista Mexicana de Fitopatología* 9: 105-110.
- Zhao, Z. Y., T. Cai, L. Tagliani, M. Miller, N. Wang, H. Pang, M. Rudert, S. Schroeder, D. Hondred, J. Seltzer and D. Pierce. 2000. *Agrobacterium*-mediated sorghum transformation. *Plant Molecular Biology* 44: 789-798.
- Zheng, S., B. Henken, E. Sofiari, E. Jacobsen, F. A. Krens and C. Kik. 1998. Factors influencing induction, propagation and regeneration of mature zygotic embryo-derived callus from *Allium cepa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53: 99-105.
- Zheng, S., L. Khrustaleva, B. Henken, E. Sofiari, E. Jacobsen, C. Kik, and F. A. Krens. 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Allium cepa* L.: the production of transgenic onions and shallots. *Molecular Breeding* 7: 101-115.

- Zheng, S., B. Henken, A. R. de Maagd, A. Purwito, F. A. Krens and C. Kik. 2005. Two different *Bacillus thuringiensis* toxin genes confer resistance to beet armyworm (*Spodoptera exigua* Hübner) in transgenic *Bt*-shallots (*Allium cepa* L.). *Transgenic Research* 14: 261-272.
- Zupan, J., T. R. Muth, O. Draper and P. Zambryski. 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal* 23: 11-28.

CAPITULO I

REGENERACIÓN *in vitro* DE PLANTAS DE CEBOLLA (*Allium cepa* L.)

Publicado como ARTÍCULO en Agrocienca 39: 647-655 (2005).

1.1. RESUMEN

La cebolla (*Allium cepa* L.) es una de las principales hortalizas cultivadas en México; sin embargo, no hay estudios relacionados con la regeneración *in vitro* de variedades comerciales sembradas en nuestro país. En este trabajo se presenta una metodología que permite la regeneración de plantas de las variedades Cristal y El Toro. Explantes de ápices de raíces de plántulas de 2 d de edad se cultivaron en el medio de Chu *et al.* (N6) más dos concentraciones de ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (0.5 ó 1.0 mg L⁻¹) y con o sin 6-furfurilaminopurina (cinetina) (0.5 ó 1.0 mg L⁻¹). El porcentaje de explantes que formaron plantas y el número de plantas formadas por explante no fue estadísticamente diferente ($p > 0.05$) entre las cuatro combinaciones de 2,4-D y cinetina evaluadas. La variedad Cristal mostró mayor porcentaje de explantes con plantas y número de plantas por explante. Se obtuvieron plantas después de 16 semanas de haber iniciado el cultivo y éstas formaron microbulbos¹, los cuales alcanzaron hasta 3 cm de diámetro (bulbos)² cuando se transplantaron en invernadero. El protocolo desarrollado permite la propagación de variedades de importancia económica para nuestro país. La respuesta *in vitro* obtenida superó a la reportada por otros autores. Los callos embriogénicos obtenidos pueden emplearse para incorporar transgenes a la planta de cebolla.

¹ Bulbos pequeños que se forman en la base de las plantas durante el cultivo *in vitro* y que tienen un diámetro no mayor de 0.7 cm.

² Estructuras que se originan de los microbulbos cuando éstos son cultivados en invernadero.

Palabras clave: *Allium cepa*, ápices de raíz, callos embriogénicos, cultivo de tejidos, reguladores del crecimiento.

***In vitro* REGENERATION OF ONION (*Allium cepa* L.) PLANTS**

1.2. ABSTRACT

Onion is one of the main vegetable crops in México; however, there are no studies related to *in vitro* regeneration of varieties of commercial importance, grown in our country. In this paper, the development of a methodology for *in vitro* plant regeneration of Cristal and El Toro onion varieties, is presented. Root tip explants of two-day-old seedlings were cultured in Chu *et al.* medium (N6) plus two concentrations of 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-D) (0.5-1.0 mg L⁻¹) and with or without 6-furfurylaminopurine (kinetin) (0.5-1.0 mg L⁻¹). Response, regarding the percentage of explants producing plants, and the number of plants produced per explant, was not statistically different ($p>0.05$) amongst four evaluated media. Cristal variety showed higher percentage of both, explants producing plants and number of plants produced per explant. Plants were obtained 16 weeks after initiating the culture, and all of them formed microbulbs³, that reached up to 3 cm in diameter (bulbs)⁴ as they were transplanted to the greenhouse.

The developed protocol allows for the propagation of cultivars of economic importance for México. The observed *in vitro* response exceeded that reported by other authors. The embryogenic calluses obtained may be utilized to incorporate transgenes to the onion plant.

Key words: *Allium cepa*, root tips, embryogenic calluses, tissue culture, growth regulators.

1.3. INTRODUCCIÓN

La cebolla (*Allium cepa* L.) es uno de los principales cultivos comestibles del género *Allium*, y la segunda hortaliza más producida en el mundo después del tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) (SAGARPA, 2004). En México, la cebolla ocupa el cuarto lugar de producción entre las hortalizas y se cultiva en casi todo el país; además, es el principal exportador de esta hortaliza a los EE.UU.

Uno de los propósitos del mejoramiento genético vegetal es incorporar resistencia a enfermedades y a plagas, o a condiciones adversas del ambiente, así como mejorar sabor, color, forma y tamaño de los órganos de importancia antropocéntrica. En los programas de mejoramiento genético de especies de *Allium*, la hibridación ha sido la vía clásica que ha permitido la variación genética en las nuevas variedades. Sin embargo, es difícil superar barreras pre y post fertilización para la hibridación, como desórdenes en el tubo polínico, limitada recombinación entre los genomas, y producción de una insignificante cantidad de semillas.

La propagación *in vitro* permite la regeneración de plantas de un genotipo deseable en condiciones asépticas y se utiliza con la intención de producir plantas libres de enfermedades, lograr la propagación clonal, la conservación de germoplasma, el rescate de híbridos interespecíficos estériles y la transformación genética (Eady, 1995).

La regeneración *in vitro* de cebolla se ha practicado vía organogénesis (Kamstaityte y Stanys, 2002) y embriogénesis somática (Saker, 1997; Zheng *et al.*, 1998; Tanikawa *et al.*, 1998) empleando distintas partes de la plantas como explante; no obstante, la frecuencia de regeneración ha sido baja (de 1 a 6 plantas por explante). Los protocolos para obtener explantes implican procedimientos laboriosos (disección de embriones

sexuales, de ápices de vástago o de la placa basal), o sólo contemplan la fase *in vitro*. El cultivo de ápices de raíces puede considerarse como una opción en el establecimiento de protocolos de regeneración *in vitro* de cebolla, pues tales órganos pueden obtenerse fácilmente de plántulas y de bulbos de plantas adultas.

Asimismo, el cultivo de ápices ha permitido la regeneración de plantas de algunas variedades de cebolla (Dunstan y Short, 1978) y de otras especies del género *Allium*, como el ajo (*Allium sativum* L.) (Myers y Simon, 1998; Robledo-Paz *et al.*, 2000). Si bien se han regenerado *in vitro* plantas de cebolla de variedades que se cultivan en Japón, Corea del Sur, Nueva Zelanda, Brasil y Estados Unidos, no se conocen resultados de investigaciones de este tipo en variedades que se cultiven en México. Dado que la respuesta al cultivo *in vitro* depende del genotipo (Van der Valk *et al.*, 1992; Saker, 1997; Zheng *et al.*, 1998), es necesario generar una metodología específica para los genotipos de interés.

Por lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo desarrollar un sistema de regeneración *in vitro* de dos variedades de importancia comercial para México, Cristal y El Toro, mediante el cultivo de ápices de raíces.

1.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y medios de cultivo

Se utilizaron semillas de *Allium cepa* L. de las variedades Cristal White Wax y El Toro (envasadas al vacío) de la marca WESTAR Seed International Inc., proveniente de El Centro, California, EE.UU.

Inducción de callos embriogénicos

Las semillas se colocaron en una solución que contenía 1 g L⁻¹ de Fungimycin 100 [18.1% (p/v) estreptomycina y 2.0% (p/v) oxitetraciclina], y 1 g L⁻¹ de Daconil [75% (p/v) Clorotalonil tetracloro isotalonitrilo] (Química Industrial Agrícola, S. A., México) durante 15 h. Las semillas se transfirieron a una solución de 1.8% de cloro activo (v/v) (Cloralex®, México), a la cual se adicionaron 4 mL L⁻¹ de Tween 20 (SIGMA Chemical, USA). En esta solución las semillas permanecieron 20 min; después se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Las semillas se colocaron en frascos de 100 mL con 25 mL de medio de Murashige y Skoog (1962) al 50 % con 1.5 % de sacarosa, y se incubaron en cuarto de crecimiento a 26 ± 2 °C en obscuridad. Después de 2 d, los ápices de las raíces que medían 3 mm de longitud aproximadamente, se cortaron con bisturí y se colocaron en cajas Petri con 30 mL de medio de Chu *et al.* (1975) (N6) con vitaminas de MS, 2.0.% de sacarosa y distintas concentraciones de 2, 4-D (0.5 y 1.0 mg L⁻¹) solo o en combinación con cinetina (0.5 y 1.0 mg L⁻¹). El pH del medio se ajustó a 5.8 ± 0.1 y se esterilizó en autoclave a 1.05 kg cm⁻² y 121 °C durante 15 min. Asimismo, se le agregó 0.7% (p/v) de agar-agar, purificado y exento de inhibidores (Merck, Darmstadt, Alemania). Los cultivos se incubaron en oscuridad durante ocho semanas, cambiándolos a un medio fresco cada cuatro semanas.

Desarrollo de los embriones y formación de microbulbos

Los explantes con callo se transfirieron a un medio MS libre de reguladores donde permanecieron tres semanas. Se cultivaron en frascos de 100 mL con 25 mL de medio

MS con 1.0 mg L^{-1} BA durante tres semanas, se transfirieron al otro con 0.5 mg L^{-1} BA por dos semanas más y las plantas diferenciadas se regresaron al medio MS sin reguladores para continuar su desarrollo. Los cultivos se colocaron en una cámara de ambiente controlado a $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ con fotoperíodo de 16 h luz (lámparas de luz blanca fría fluorescente, con intensidad lumínica de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y 8 h de oscuridad.

Las plantas regeneradas se sometieron a un período de frío ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) por dos semanas, condición necesaria para la formación de microbulbos, cuya presencia se logró después de un periodo de incubación en cámara de crecimiento a $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Las plantas que formaron microbulbos se transplantaron a invernadero para la fase final de establecimiento.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se empleó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones en arreglo factorial, de dos factores: variedades (dos) y combinaciones de 2,4-D y cinetina (cuatro), o sea ocho tratamientos. La unidad experimental fue un grupo de 20 explantes. Las variables analizadas fueron el porcentaje de explantes que formaron callos embriogénicos, el porcentaje de explantes que regeneraron plantas a las 12 semanas de haber iniciado el cultivo, y el número promedio de plantas por explante a las 16 semanas de haber iniciado el cultivo. Se efectuó un análisis de varianza con las variables explantes que regeneraron plantas y número promedio de plantas producidas por explante, dado que la variable porcentaje de explantes que formaron callos embriogénicos registró 100% para todos los tratamientos. La variable porcentaje de explantes que regeneraron plantas previamente fue transformada a logaritmo base 10. La comparación de medias se efectuó la prueba de la diferencia mínima significativa

(DMS, 0.05), y los promedios se presentan en las unidades originales. Los datos se analizaron con SAS (1999).

Transferencia al suelo de las plantas con microbulbos

Las plantas que formaron microbulbos *in vitro* se extrajeron de los frascos y se lavaron con agua corriente con el objeto de eliminar los residuos de medio de cultivo. Luego, las plantas se sumergieron en una solución de Daconil 1% (p/v) durante 2 min y se transfirieron a vasos de unicel de 240 mL conteniendo como sustrato tierra negra de monte, tierra lama y tierra de hoja en proporción equivalente (GARDEN'S, México). Las plantas se cubrieron con una bolsa de polietileno transparente de 0.5 kg de capacidad, donde se hizo 15 a 20 perforaciones con una aguja. Los vasos se mantuvieron dos semanas en una cámara de crecimiento a 26 ± 2 °C con 16 h de iluminación. Después se pasaron a bolsas de 10 kg de capacidad y se llevaron a un invernadero donde se fertilizaron con la mitad de la fórmula 15:30:15 (N, P, K) de Miracle-Gro® (Scotts Co., EE.UU.) por dos semanas, y después con la dosis completa cada semana, con el fin de que los microbulbos se convirtieran en bulbos.

Los bulbos obtenidos a partir de los microbulbos se secaron 30 días a temperatura ambiente para retirar las hojas y la raíz (cura), se sometieron a frío (10 °C) por 30 d más, se pasaron a suelo y se llevaron a una cámara de crecimiento a 22 ± 1 °C, donde emitieron el vástago y las raíces.

1.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las distintas concentraciones de 2,4-D solo o combinado con cinetina, permitieron la formación de callos embriogénicos en 100% de los ápices de raíz cultivados para

ambas variedades. En el Cuadro 1.1 se muestran los resultados del análisis de varianza. En el porcentaje de explantes que formaron plantas y el número promedio de plantas producidas por explante hubo diferencias altamente significativas entre variedades; sin embargo, no hubo significancia para los tratamientos ni para la interacción entre variedades y las combinaciones de 2,4-D y cinetinaA.

Cuadro 1.1. Cuadrados medios para las variables porcentaje de explantes con plantas y número promedio de plantas por explante.

Factor de Variación	Grados de libertad	Cuadrados Medios	
		Porcentaje de explantes con plantas	Plantas por explante
Variedades (V)	1	3.129**	223.26**
Combinaciones de 2,4-D y cinetina (C)	3	0.364 ns	7.67 ns
VxC	3	0.230 ns	3.18 ns
Error	16	0.255	16.86
Total	23		
CV (%)		14	82

** = altamente significativo

ns = no significativo

En el Cuadro 1.2 se presentan los promedios de ambas variables para los factores variedades y combinación de reguladores de crecimiento.

La variedad Cristal casi duplicó el porcentaje de explantes que regeneraron plantas y produjo casi cuatro veces más plantas por explante que la variedad El Toro (Cuadro 1.2). Esto indica que la eficiencia no es la misma en las dos variedades, por lo que existen factores genéticos involucrados en la respuesta a dichas variables y la

caracterización y ubicación en el genoma representaría un campo de estudio de gran interés.

Cuadro 1.2. Promedios de explantes con plantas y plantas formadas por explante inducidos en variedades de cebolla crecidos en diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento.

Combinaciones de 2,4-D y cinetina (mg L ⁻¹)	Variedades		Promedio
	Cristal	El Toro	
Explantes con plantas (%)			
2,4-D, 1.0	73.3	40.0	56.7 a
2,4-D, 0.5	66.7	35.0	50.9 a
2, 4-D, 0.5; cinetina, 0.5	50.0	38.3	44.2 a
2, 4-D, 1.0; cinetina, 1.0	55.0	21.7	38.4 a
Promedio	61.3 a	33.8 b	47.6
Plantas por explante			
2, 4-D, 1.0	10.6	2.7	6.6 a
2, 4-D, 0.5	8.0	1.9	5.0 a
2, 4-D, 0.5; cinetina, 0.5	6.5	1.8	4.2 a
2, 4-D, 1.0; cinetina, 1.0	7.9	1.3	4.6 a
Promedio	8.3 a	1.9 b	5.1

Promedios entre variedades o entre tratamientos de cultivo con diferente letra son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

La presencia de los fitorreguladores en el medio de cultivo empleado y en esas concentraciones, fue suficiente para inducir callos embriogénicos, lo que concuerda con lo reportado para otras monocotiledóneas como maíz (*Zea mays*) (Armstrog y Green, 1985) y ajo (*Allium sativum* L.) (Robledo-Paz *et al.*, 2000). Asimismo, las sales del

medio N6 resultaron propicias para la inducción de callos en distintas monocotiledóneas (Robledo-Paz *et al.*, 2000), lo que sería corroborado con los resultados del presente trabajo.

La respuesta morfogénica de los explantes se inició con un incremento de hasta cinco veces su tamaño después de 30 d de cultivo en el medio de inducción. La proliferación celular se detectó en el sitio de corte, concentrándose en las zonas meristemáticas del explante (Figura 1.1 A). Haque *et al.* (1997) y Robledo-Paz *et al.* (2000) también observaron formación de callo sólo en la zona meristemática de ápice de la raíz. Los callos producidos después de ocho semanas fueron de dos tipos, uno de color amarillo claro, compacto y translúcido y otro amarillo intenso, opaco, fácilmente disgregable (friable), con características similares a los reportados por Van der Valk *et al.* (1992) y Zheng *et al.* (1998) en *Allium cepa*. Además, los callos de la variedad Cristal fueron más friables y de color amarillo más intenso que los de la variedad El Toro, hubo diferencias entre genotipos, lo que concuerda con lo mencionado por Novák *et al.* (1986), quienes encontraron pigmentación diferencial entre genotipos.

Se obtuvieron callos embriogénicos (Figura 1.1B) en presencia únicamente de 2, 4-D y en combinación con cinetina. Sin embargo, la formación de plantas a partir de estos callos fue numéricamente menor cuando los callos embriogénicos fueron inducidos en los medios que contenían 2,4-D y cinetina (Cuadro 1.2). Estos resultados contrastan con lo reportado por Robledo-Paz *et al.* (2000) y Van der Valk *et al.* (1992) para tejidos de ajo y cebolla, pero concuerdan con lo observado en cultivos embriogénicos de cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) (Baker y Wetzstein, 1994) y chile (*Capsicum annuum*

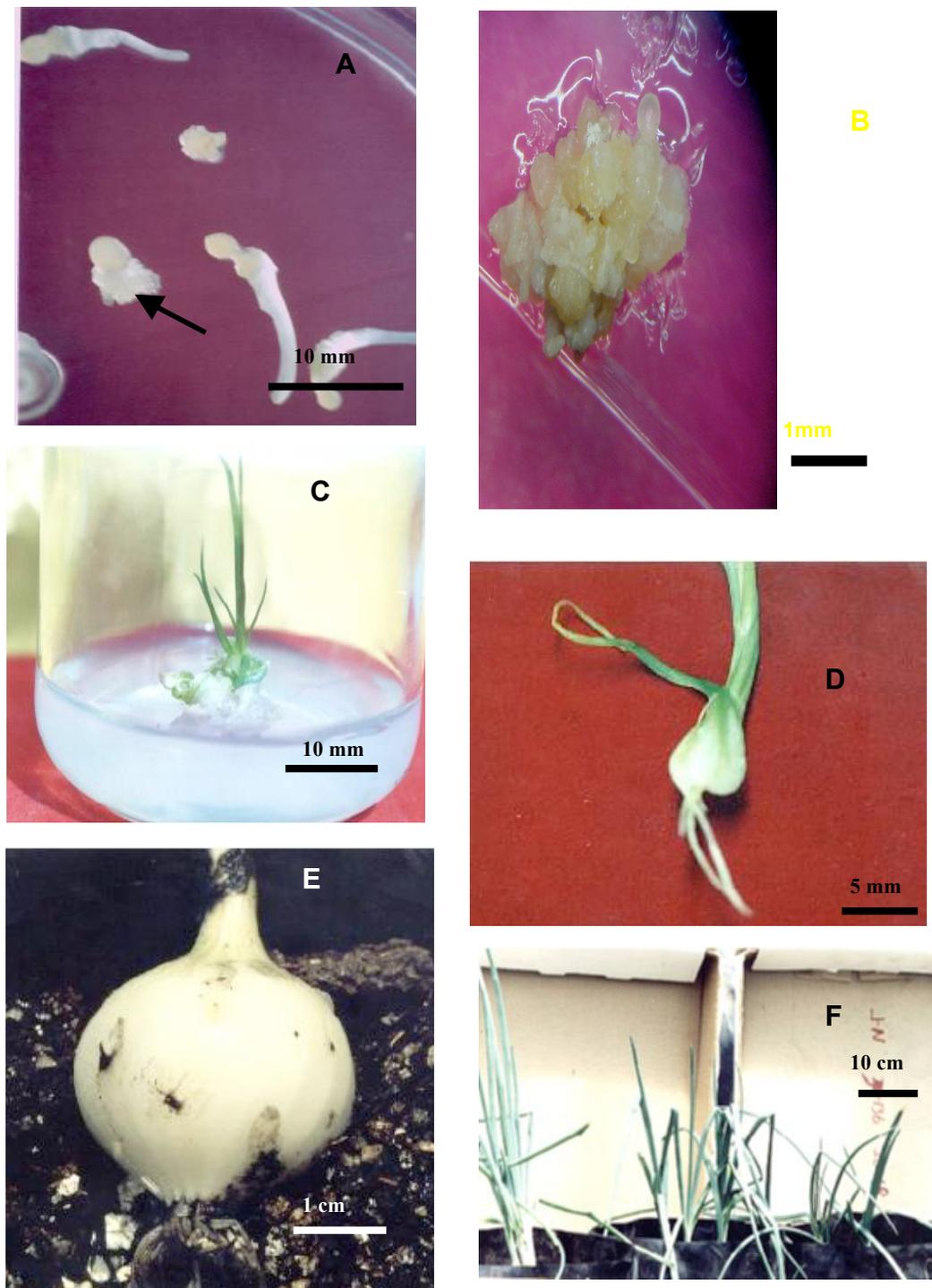


Figura 1.1. Regeneración *in vitro* de plantas de cebolla (*Allium cepa* L.). A: ápices de raíz después de cuatro semanas en el medio de inducción (2,4-D, 0.5 mg L⁻¹). B: callo embriogénico después de ocho semanas de cultivo en un medio con 0.5 mg L⁻¹ de 2, 4-D . C: plantas regeneradas después de 16 semanas de iniciar el cultivo. D: formación de microbulbos en las plantas regeneradas *in vitro*. E: bulbo después de 12 semanas de estar creciendo en invernadero. F: plantas obtenidas a partir de bulbos obtenidos en el invernadero.

L.) (Steinitz *et al.*, 2003). La poca influencia de la cinetina en la regeneración de plantas de cebolla podría deberse a que los niveles usados de este fitorregulador fueron mayores o menores que las concentraciones requeridas para establecer el nivel hormonal endógeno adecuado que influyera positivamente en las células de los ápices de raíz en su capacidad para regenerar plantas. Lo anterior obedece a que la respuesta del explante está en función de los niveles hormonales endógenos de éste durante el cultivo *in vitro* (Fehér *et al.*, 2003). La función inductora del 2,4-D en la embriogénesis somática ha sido observada por otros autores (Van der Valk *et al.*, 1992; Zeng *et al.*, 1998; Myers y Simon, 1998), y se confirma con los resultados del presente trabajo. Se ha demostrado que el 2,4-D estimula la síntesis de otras auxinas como el ácido indolacético (AIA) en células de zanahoria (*Daucus carota* L.) (Michalczyk *et al.*, 1992). Asimismo, se ha propuesto que el 2,4-D podría actuar no sólo como una auxina, sino también como un herbicida, el cual induce respuestas a estrés (Grossmann, 2000). Lo anterior se fundamenta en el hecho de que la presencia del 2,4-D en el medio de cultivo induce la expresión de varios genes relacionados con el estrés en células de alfalfa (*Medicago sativa*) (Györgyey *et al.*, 1991; Davletova *et al.*, 2001).

Tres semanas después de que los callos se transfirieron a medio MS libre de reguladores del crecimiento triplicaron su tamaño, advirtiéndose la presencia de algunos embriones de los cuales emergían el vástago y la raíz para convertirse en plantas. El mantener las plantas en los medios MS con 1 mg L⁻¹ ó 0.5 mg L⁻¹ de BA y sin reguladores promovió su crecimiento hasta un tamaño en el cual pudieron someterse a un tratamiento que indujera la formación de microbulbos.

Las plantas regeneradas *in vitro* que se mantuvieron a 4 °C por 15 d, formaron microbulbos en su base dos semanas después de retiradas de esta condición. Los microbulbos continuaron su crecimiento hasta convertirse en bulbos que alcanzaron un tamaño de 3 cm de diámetro después de 32 semanas de haber iniciado el cultivo de ápices (Figura 1.1E), y a las 52 semanas de tal inicio, las plantas de cebolla obtenidas de estos bulbos aún continuaban su crecimiento en el invernadero (Figura 1.1F).

Aunque Dunstan y Short (1978) emplearon ápices de raíces para regenerar plantas de algunas variedades de cebolla (Giant Zittau e Inai Early Yellow), era necesario establecer las condiciones de cultivo *in vitro* que indujeran la mejor respuesta en variedades de interés para México como Cristal y El Toro. Asimismo, aunque se ha reportado la regeneración de plantas de cebolla a partir de otros explantes (Van der Valk *et al.*, 1992; Mohamed-Yasseen y Splittstoesser, 1992; Saker 1997; Zheng *et al.*, 1998), la mayoría de estos protocolos sólo contemplan la fase *in vitro*, por lo que no proporcionan información acerca de el tiempo requerido para el establecimiento de las plantas en suelo, ni se ha dado seguimiento al desarrollo de la planta hasta la formación del bulbo. Estos aspectos merecen ser considerados, puesto que la respuesta evaluada *in vitro* no garantiza el éxito de las plantas cuando crecen en invernadero o campo. Las ventajas que ofrece el presente protocolo de regeneración *in vitro*, no reportado con anterioridad, son: 1) permite la propagación de variedades cebolla de importancia económica para México; 2) la respuesta *in vitro* supera la reportada por Dunstan y Short (1978), quienes al usar ápices de raíces como explante sólo regeneraron en promedio 4.5 brotes adventicios por ápice, mientras que en el presente protocolo se obtuvieron ocho plantas promedio por explante, y algunos

explantes lograron formar hasta 19 plantas; 3) las plantas regeneradas pueden formar microbulbos a 20 semanas de iniciado el cultivo de los ápices y los microbulbos pueden usarse como propágulos o semilla sana de genotipos seleccionados, que podría complementar la propagación a través de semilla botánica; 4) las raíces emitidas de cada microbulbo producido *in vitro* también pueden emplearse como explantes para producir nuevas plantas, lo que potencia la eficiencia de regeneración de este protocolo; 5) los callos morfogénéticos inducidos con las condiciones de cultivo desarrolladas en el presente estudio, muestran una alta velocidad de crecimiento cuando se cultivan a intervalos regulares (15 d), lo que indica que las células de estos callos tienen la capacidad para integrar y expresar genes introducidos por ingeniería genética a la cebolla, considerada una especie difícil de manipular por esta tecnología (Eady, 1995). Si la fuente de explantes (ápices de raíces) no fuera una plántula sino un bulbo (que puede formar cerca de 70 raíces), sería posible regenerar hasta 581 plantas por bulbo en cuatro meses.

1.6. CONCLUSIONES

Se estableció un protocolo para regenerar *in vitro* plantas de las variedades de cebolla Cristal y El Toro.

Los ápices de raíces obtenidos de plántulas fueron adecuados como explantes. El sistema establecido permite obtener plantas en cuatro meses las cuales pueden desarrollarse hasta la formación de bulbos. La capacidad de regeneración fue mayor en Cristal que en El Toro.

1.7. LITERATURA CITADA

- Armstrog, C. L., and C. E. Green. 1985. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* 164: 209-214.
- Baker, C. M., and H. Y. Wetzstein. 1994. Influence of auxin type and concentration on peanut somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 36: 361-368.
- Chu, C. C., C. C. Wang, C. S. Sun, C. Hsu, K. C. Yin, C. Y. Chu and F. Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica* 18: 659-688.
- Davletova, S., T. Meszaros, P. Miskolczi, A. Oberschall, K. Torok, D. Dudits, and M. Deak. 2001. Auxin and heat shock activation of a novel member of the calmodulin like domain protein kinase gene family in cultured alfalfa cells. *Journal of Experimental Botanic* 52: 215-221.
- Dunstan, D. I., and K. C. Short. 1978. Shoot production from onion callus tissue cultures. *Scientia Horticulturae* 9: 99-110.
- Eady, C. C. 1995. Towards the transformation of onion (*Allium cepa* L.). *N. Z. J. Crop and Horticultural Science* 23: 239-250.
- Fehér, A., T. P. Pasternak, and D. Dusits. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 74: 201-228
- Grossmann, K. 2000. Mode of action of auxinic herbicides: a new ending to a long, drawn out story. *Trends Plant Science*. 5: 506-508.

- Györgyey, J., A. Gartner, K. Nemeth, Z. Magyar, H. Hirt, E. Heberle-Bors, and D. Dudits. 1991. Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant Molecular Biology* 16: 999-1007.
- Haque, M. S., T. Wada, and K. Hattori. 1997. High frequency shoot regeneration and plantlet formation root tip of garlic. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 50: 83-89.
- Kamstaityte, D., and V. Stanys. 2002. Pathways of onion regeneration via flower and ovary culture. *Zemdirbyste, Mokslo Darbai* 78: 245-250.
- Michalczyk, L., T. J. Cooke, and J. D. Cohen. 1992. Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. *Phytochemistry* 31: 1097-1103.
- Mohamed-Yasseen, Y., and W. E. Splittstoesser. 1992. Regeneration of onion (*Allium cepa* L.) bulbs *in vitro*. *Plant Growth Regulator Soc. Am. Q.* 20: 76-82.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15: 473-497.
- Myers, J. M., and P. W. Simon. 1998. Continuous callus production and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) using root segments from shoot tip-derived plantlets. *Plant Cell Reports* 17: 726-730.
- Novák, F. J., L. Havel, and J. Dolezel. 1986. *Allium*. In: Evans, D. A., W. R. Sharp, and P. V. Ammirato (eds). *Handbook of Plant Cell Culture*. Macmillan, New York. pp: 419-456.
- Robledo-Paz, A., V. M. Villalobos-Arambula, and A. E. Jofre-Garfias. 2000. Efficient plant regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by root tip culture. *In Vitro Cellular Development Biology Plant* 36: 416-419.

- SAS Institute Inc. 1999. Procedures Guide, Version 8. SAS®. 1643 p.
- SAGARPA. 2004. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola 2003.
- Saker, M. M. 1997. *In vitro* regeneration of onion through repetitive somatic embryogenesis. *Biologia Plantarum* 40: 499-506.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México D.F. <http://www.sagarpa.gob.mx>. Agosto 2004.
- Steinitz, B., M. Küsek, Y. Tabib, I. Paran, and A. Zelcer. 2003. Pepper (*Capsicum annuum* L.) regenerants obtained by direct somatic embryogenesis fail to develop a shoot. *In Vitro Cellular Development Biology Plant* 39: 296-303.
- Tanikawa, T., M. Takagi, and M. Ichii. 1998. Varietal differences in plant regeneration from solid and suspension cultures in onion (*Allium cepa* L.). *Journal Japan. Horticultural Science* 67: 856-861.
- Van der Valk P., O. E. Scholten, F. Verstappen, R. C. Jansen, and J. J. M. Dons. 1992. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo-derived callus cultures of three *Allium* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 30: 181-191.
- Zheng, S., B. Henken, E. Sofiari, E. Jacobsen, F. A. Krens, and C. Kik. 1998. Factors influencing induction, propagation and regeneration of mature zygotic embryo-derived callus from *Allium cepa*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 53: 99-

CAPITULO II
TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CEBOLLA (*Allium cepa* L.)
MEDIANTE BIOBALÍSTICA

2.1. RESUMEN

La cebolla (*Allium cepa*) es en orden de importancia la cuarta hortaliza que se produce en México. Un sistema alternativo para la producción de semilla y mejoramiento del cultivo es la ingeniería genética, mediante la cual se le puedan incorporar a la planta de cebolla genes que permitan obtener variedades con nuevas características. El objetivo de la presente investigación fue desarrollar un protocolo de transformación genética de cebolla mediante biobalística. Los explantes fueron callos embriogénicos derivados de ápices de raíces de plántulas de 2 días de edad de la variedad Cristal. Dichos callos se bombardearon con los plásmidos pWRG1515, pRDTAS, pODC y pCS. El co-bombardeo de los callos con los plásmidos pWRG1515/pODC y pWRG1515/pRDTAS permitió obtener en promedio de 2 y 1.3 clonas transgénicas por gramo de peso fresco, respectivamente. Estas clonas tuvieron expresión del gen *gusA*, aun después de un año y medio de efectuar el bombardeo. La presencia en las células de cebolla de los genes *gusA* y *hph* fue confirmada mediante ensayos de PCR. Las plantas obtenidas presentaron hojas hiperhidratadas y deformes.

Palabras clave: *Allium cepa*, callos embriogénicos, cultivo de tejidos, ingeniería genética.

GENETIC TRANSFORMATION OF ONIONS (*Allium cepa* L.) THROUGH BIOBALISTICS

2.2. ABSTRACT

Onion (*Allium cepa*) is the fourth most important vegetable produced in Mexico. An alternative system for seed production and crop improvement is through genetic engineering which can be used to incorporate genes to the onion plant in order to produce varieties with novel characteristics. The objective of this research was to develop a protocol for genetic transformation of onion through biobalistics. The explants were embryogenic calluses derived from roots tips of two-day-old seedlings of the Cristal cultivar. Calluses were bombarded with pWRG1515, pRDTAS, pODC and pCs plasmids. Co-bombardment of calluses with plasmids pWRG1515/pODc and pWRG1515/pRDTAS yielded an average of 2 and 1.3 transgenic clones per gram of fresh weight, respectively. Those clones presented high *gusA* gene expression even a year and a half after bombardment. The presence of *gusA* and *hph* genes in the onion cells was confirmed by PCR. The leaf plants were hiperhidratadas and deforms.

Keywords: *Allium cepa*, embryogenic calluses, tissue culture, genetic engineering.

2.3. INTRODUCCIÓN

La cebolla (*Allium cepa*) se ubica entre las hortalizas más importantes en el mundo. En México se cultiva en 23 estados, en 2008 el rendimiento promedio nacional fue de 26.7 t ha⁻¹ (SAGARPA, 2008).

Entre los problemas que se presentan en el cultivo de la cebolla, está la incidencia de plagas y enfermedades que causan pérdidas considerables durante el

período vegetativo y el almacenamiento (Fritsch y Friesen, 2002). Aunado a esto, la corta viabilidad de su semilla y falta de métodos adecuados para producir semilla mejorada (Hernández-Livera *et al.*, 1999), su hábito bianual (Hanelt *et al.*, 1990), esterilidad y pobre fertilidad de los híbridos interespecíficos (Kik, 2002), así como, el tiempo que se requiere para liberar un híbrido en un programa de mejoramiento (15 a 20 años) (Pérez *et al.*, 1997), son otras desventajas que se presentan en el cultivo de la cebolla.

La ingeniería genética es una tecnología mediante la cual se podrían incorporar a la planta de cebolla genes que permitan obtener variedades con nuevas características, siendo una buena alternativa en un programa de mejoramiento genético (Eady *et al.*, 1996).

Los métodos de transformación genética comúnmente usados son los que utilizan *Agrobacterium tumefaciens* como vector o bien el bombardeo de micropartículas. El desarrollo de técnicas de transferencia directa de genes ha permitido la transformación de algunas monocotiledóneas (Cabrera-Ponce *et al.*, 1997; Kihara *et al.*, 1998; O'Connor-Sánchez *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2004).

Aún cuando la cebolla es un cultivo económicamente importante, fue hasta 1996 con el trabajo de Eady *et al.*, que se vislumbró la posibilidad de incorporar nuevos genes a esta especie mediante ingeniería genética. A partir de este momento se han publicado nuevos protocolos de transformación para distintos cultivares de cebolla, principalmente mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens* (Eady *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2001; Eady *et al.*, 2003). A pesar de los adelantos tecnológicos, en México no se ha generado información sobre esta área del conocimiento en cebolla, por lo que,

la presente investigación tuvo como objetivo desarrollar un protocolo de transformación genética de un genotipo de importancia económica para el país mediante el bombardeo de micropartículas.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y medios de cultivo

Se colocaron 300 mg de callo embriogénico de la variedad Cristal, obtenido mediante la metodología desarrollada por Quintana-Sierra *et al.* (2005) en cada una de 40 cajas de petri. Dichas cajas contenían 30 mL de medio N6 (sales de Chu *et al.*, 1975), 0.5 mg L⁻¹ de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) y 3 % (Medio 1) ó 12 % (Medio 2) de sacarosa (tratamiento osmótico), en donde permanecieron por 24 horas antes y después del bombardeo.

ADN usado para la transformación genética

Los plásmidos empleados fueron 1) pWRG1515, que contenía el gen *hph* que confiere resistencia a higromicina y el gen *gusA* bajo el control del promotor CaMV35S, y la región terminadora del gen de la nopalina sintasa (Christou *et al.*, 1991); 2) el plásmido pRDTAS con el gene *nptII* que confiere resistencia a kanamicina, el gen de la trehalasa de alfalfa en antisentido (permite la acumulación de trehalosa, tiene como fondo genético el pBI21) bajo el control del promotor rd29A y el gen *gusA*; 3) el plásmido pODC con el gene *nptII*, el gen *odc* que codifica para la enzima ornitina descarboxilasa (permite la acumulación de poliaminas) y el gen *gusA*; y 4) el plásmido pCS con el gene *nptII* y el gen que codifica para una citrato sintasa que confiere

resistencia al aluminio. Cada uno de los plásmidos se co-bombardearon con el plásmido pWRG1515.

Preparación de los microproyectiles con el ADN

Se utilizaron micropartículas de tungsteno M10 (0.73 μm de diámetro), las cuales se recubrieron con el ADN plasmídico de acuerdo con el protocolo reportado por Tomes *et al.* (1995), modificado por Cabrera Ponce *et al.* (1997) usando la siguiente mezcla: 50 μL de una suspensión de partículas (15 mg mL^{-1}), 5 μL de cada uno de los plásmidos ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), 50 μL de CaCl_2 2.5 M y 20 μL de espermidina 0.1 M. La mezcla se sonicó y centrifugó a 10800 g_n por 10 s, entonces la pastilla se recuperó y resuspendió en 60 μL de etanol absoluto. Se colocaron 10 μL de esta suspensión en cada macrocarreador (Anexo, Apartado 2).

Bombardeo

El bombardeo se llevó a cabo con una pistola de helio (PDS 1000-He BioRad) a 900 psi de presión. Se hizo un disparo por placa y ésta se colocó a 7 cm del punto de disparo; el macrocarreador permaneció a 1.2 cm de la membrana de ruptura; la cámara de disparo se evacuó a 0.07 atm.

Expresión transitoria del gen reportero *gusA*

Para evaluar la actividad del gen *gusA* se realizó un ensayo histoquímico colocando callos bombardeados y no bombardeados en cajas de microtítulo con una solución de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido (x-gluc) (500 mg L^{-1}) (McCabe *et al.*, 1988)

(Anexo, Apartado 1). Las cajas se incubaron a 37°C por 24 a 48 horas, realizando observaciones al microscopio estereoscópico. La evaluación se repitió doce meses después del bombardeo.

Selección de las células transgénicas

Después del bombardeo, los callos se cultivaron en el medio con 3% de sacarosa durante 10 días, antes de transferirlos al mismo Medio pero con 20 mg L⁻¹ de higromicina y 100 mg L⁻¹ de kanamicina (medio de selección). Los callos se subcultivaron cada dos semanas a medio selectivo fresco hasta que las células del tratamiento testigo (sin bombardear) murieron y se observó el crecimiento de las presuntas clonas transgénicas.

Análisis molecular del ADN de las células transformadas

Extracción y cuantificación de ADN

La extracción del ADN genómico del material transgénico de cebolla se realizó mediante los protocolos reportados por Shure *et al.* (1983) y McGarvey y Kaper (1991) (Anexo, Apartado 4). Para la cuantificación se hicieron diluciones (1:50) de la solución de ADN y se midió la absorbancia a 260 nm, asumiendo que una unidad equivale a 50 µg mL⁻¹ de ADN de doble cadena (Invitrogen, 2001)

Prueba de PCR

Para detectar el gen *hph* se llevó a cabo una reacción de amplificación por PCR con los oligonucleótidos 5'-ACTTCTACACAGCCATCGGTC-3' y 5'-

GACCTGCCTGGAAACCGAACTG-3' durante 1 min a 94 °C, 1 min a 55 y 72 °C (38 ciclos), y 5 min a 72 °C para una extensión final. Asimismo, el gen *gusA* se detectó con los oligos 5'-ATCACGCAGTTCAACGCTGAC3' (R); 5'-TTGGGCAGGCCAGCGTATCGT-3' (F) siguiendo un programa de 2 segundos a 94 °C, 40, 30 y 40 segundos a 94, 51 y 72 °C, respectivamente (35 ciclos) y 5 segundos a 72 °C para una extensión final. Los productos de la PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1 % a 100 Volts por 45 minutos. Se espera que los oligonucleótidos para el gen *hpt* amplifiquen una secuencia de 1300 pb y los del gen *gusA* una de 420 pb.

Regeneración de plantas transgénicas

Las células transgénicas (clonas) se transfirieron a un medio con las sales basales de Murashige y Skoog (1962) (MS), 1 mg L⁻¹ de BA 3 % de sacarosa y 7 g L⁻¹ de agar además de 7 y 50 mg L⁻¹ de higromicina y kanamicina, respectivamente, para inducir la regeneración de las plantas. En este medio los callos transformados permanecieron 4 semanas y luego se transfirieron a cajas con medio MS libre de reguladores , donde crecieron durante tres semanas. Posteriormente, se subcultivaron en frascos de 100 mL con 25 mL de medio MS con 1.0 mg L⁻¹ BA y 3 % de sacarosa , para luego transferirlos al medio MS más 0.5 mg L⁻¹ BA .

Asimismo, se probó el medio MS con 3 % de sacarosa y otras concentraciones y combinaciones de BA (benciladenina) (2 a 4 mg L⁻¹), ácido indolacético (AIA) (0.1 a 0.2 mg L⁻¹), 6-furfurilaminopurina (cinetina) (1 mg L⁻¹) y ácido giberélico (AG₃) (1 mg L⁻¹) . De la misma manera se estudió el efecto del nitrato de plata (3 mg L⁻¹) y el agua de coco (25 mL L⁻¹) cuando se incluía en el medio de cultivo. En las distintas

combinaciones de reguladores los callos permanecieron durante 10 semanas, para luego transferirlos al medio MS sin reguladores por dos semanas más. Todos los cultivos fueron colocados en una cámara de ambiente controlado a 26 ± 2 °C con fotoperíodo de 16 horas (lámparas de luz blanca fría fluorescente, con intensidad lumínica de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de clonas transgénicas

La expresión transitoria del gen *gusA* en los callos bombardeados con los distintos plásmidos fue evaluada después de 24 ó 48 horas (Figura 2.1A). Los callos bombardeados con los plásmidos pWRG1515/pRDTAS mostraron expresión en 75 % de los casos analizados y aquellos bombardeados con los plásmidos pWRG1515/pODC lo expresaron en 66%; mientras que 50 % de los callos transformados con los plásmidos pWRG1515/pCS expresaron el gen *gusA*.

Cuatro meses después de que los callos bombardeados crecieron en el medio de selección, los callos resistentes fueron claramente identificados por su color amarillo intenso (clonas) que contrastaba con las células no transformadas las cuales se tornaron blancas ó cafés, y tenían consistencia esponjosa y suave (Figura 2.1B). Debido a que las clonas presuntamente transgénicas no mostraron incremento en su biomasa, se redujo tanto la concentración de los antibióticos (7 y 50 mg L⁻¹ de higromicina y kanamicina, respectivamente), como la del 2,4-D (0.5 mg L⁻¹) en el medio de cultivo, por considerar que estos compuestos pudieran causar dicha inhibición en el crecimiento. No obstante, a pesar de que los callos resistentes

mostraron incremento en su biomasa en estas condiciones, éste no fue substancial a simple vista.

La falla en el crecimiento de callos es un fenómeno que puede atribuirse a la presencia del etileno, fitohormona que se puede generar como respuesta de las células a las condiciones de estrés promovido por las condiciones de cultivo *in vitro* (Biddington, 1992). De la misma forma, la producción de etileno puede incrementarse por efecto del bombardeo, ya que los microproyectiles causan múltiples perforaciones (heridas) en las células que pueden activar genes relacionados con la síntesis de este compuesto (Santamaría *et al.*, 2000; Zobayed *et al.*, 2001; Jeong *et al.*, 2006).

Considerando que la inhibición del crecimiento de los callos podría ser causada por la presencia de etileno, se decidió agregar nitrato de plata (3 mg L^{-1}) al medio de cultivo, debido a que el ion Ag^+ interfiere con la incorporación de esta fitohormona a los sitios receptores en las células, impidiendo su acción (Williams *et al.*, 1990). La adición de nitrato de plata promovió el crecimiento de las clonas, con lo que duplicaron su biomasa en dos semanas; lo que permite suponer que el etileno está estrechamente relacionado con la inhibición del crecimiento de los callos resistentes.

Por otra parte, el bombardeo de los callos con los plásmidos pWRG1515/pODC generó dos clonas transgénicas por gramo de callo, mientras bombardearlos con los plásmidos pWRG1515/pRDTAS produjo 1.3 clonas por gramo de callo. Asimismo, el bombardeo con los plásmidos pWRG1515/pCD no produjo clonas transgénicas (Cuadro 2.1).

Cabe señalar que sólo los callos cultivados con 12 % de sacarosa durante 24 horas antes y después del bombardeo lograron generar clonas transgénicas (Cuadro

2.1). Dichos resultados indican que el tratamiento osmótico mediado por la presencia de sacarosa a altas concentraciones tuvo efecto positivo en la transformación de las células de cebolla. Se postula que el estrés osmótico previo al bombardeo causa plasmólisis parcial en las células, disminuyendo la presión en el interior, con lo que se reduce o previene la muerte celular ocasionada por la expulsión de protoplasma a través de las heridas causadas por las micropartículas (Sanford *et al.*, 1991).

Cuadro 2.1. Número de clonas recuperadas a partir de callos transgénicos de la variedad Cristal bombardeados con distintos plásmidos.

Plásmidos	Sacarosa (%)	Placas bombardeadas	Número de clonas/gramo de peso fresco de callo
pWRG1515/pODC	12	5	2.0
pWRG1515/pODC	3	5	0
pWRG1515/pRDTAS	12	5	1.3
pWRG1515/pRDTAS	3	5	0
pWRG1515/pCD	12	5	0
pWRG1515/pCD	3	5	0
Sin bombardear	12	5	0
Sin bombardear	3	5	0

El efecto positivo del tratamiento osmótico también fue observado en maíz, cuya frecuencia de transformación incrementó hasta 3 veces cuando al medio se le adicionó

manitol 0.8 M antes y después del bombardeo (Kemper *et al.*, 1996). Asimismo, en arroz mejoró tanto la expresión transitoria como la transformación estable en 8 veces cuando las células fueron preincubadas con sorbitol al 2.0 M (Chen *et al.*, 1998; Suga *et al.*, 2003).

Doce meses después del bombardeo se volvió a evaluar la actividad de la β -glucuronidasa en los callos y plantas presuntamente transformadas dando reacción positiva. Las plantas regeneradas se tiñeron intensamente, lo que indicó alta expresión del gen *gusA* (Figura 2.1C).

Regeneración de las plantas transgénicas

Treinta por ciento de los callos cultivados en presencia de diferentes concentraciones de BA (0.5-1.0 mg L⁻¹), sola o en combinación con ANA (1.0 mg L⁻¹) o con 2, 4-D (0.5 mg L⁻¹) y AG₃ (1 mg L⁻¹), formaron estructuras verdes y raíces. Las estructuras verdes crecieron y dieron lugar a plántulas hasta de 1.5 cm de longitud después de ocho semanas, cabe indicar que mostraron hojas deformes e hiperhidratadas (Figura 2.1 D). De igual manera, el medio que contenía 2 mg L⁻¹ de BA y 0.1 mg L⁻¹ de AIA promovió la regeneración de plantas en 20 % de los callos, pero éstas también mostraron deformaciones. En los medios con cinetina y ácido giberélico (AG₃) se pudo observar tanto la formación de raíces como la presencia de grandes zonas verdes que no formaron brotes. Asimismo, 100 % de los callos cultivados en medio de cultivo con agua de coco formaron raíces; mientras que en los otros medios probados, se formaron zonas verdes que aunque se observaban potencialmente morfogénicas no culminaron con el desarrollo de plantas.

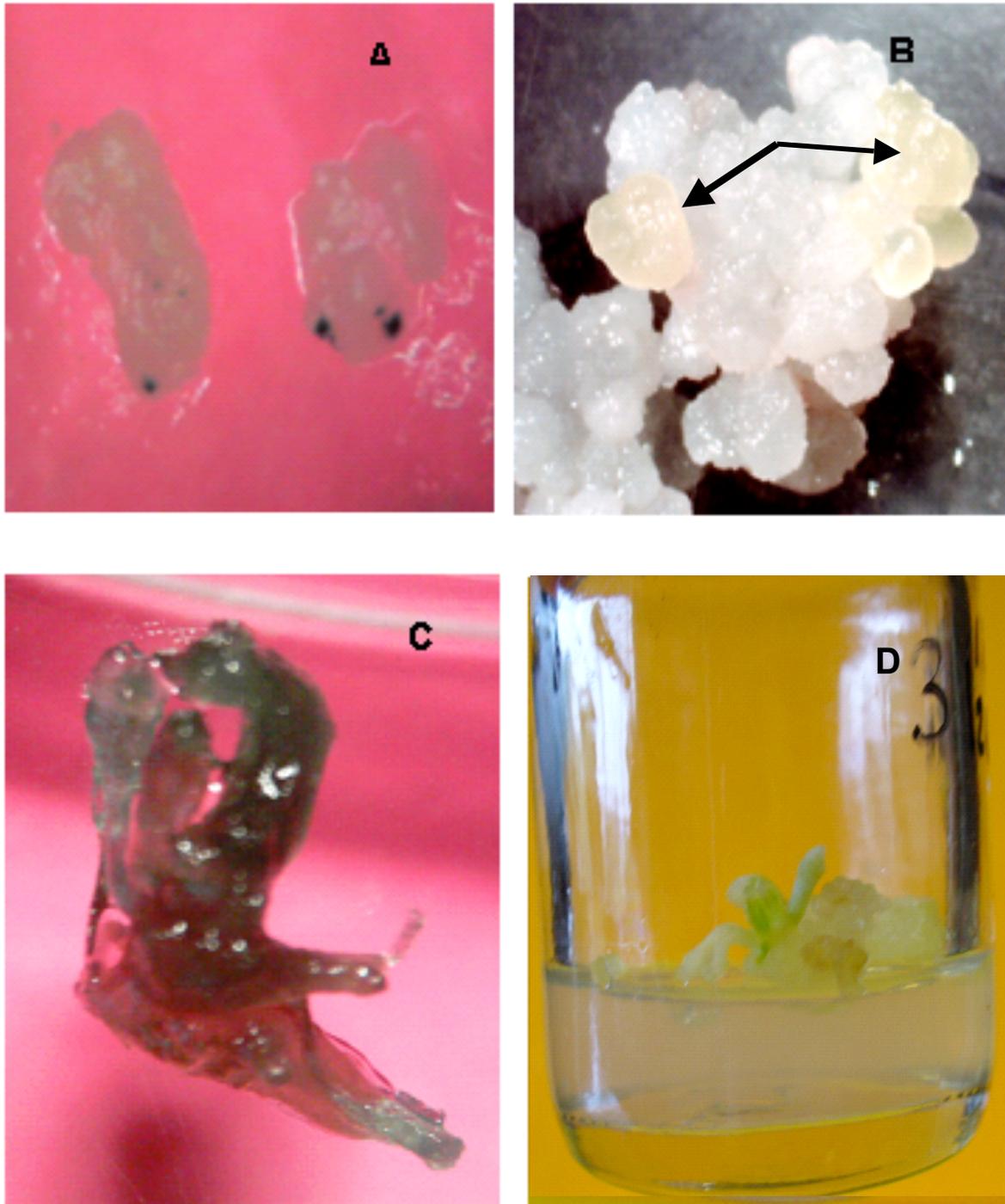


Figura 2.1. A. Expresión transitoria del gen *gusA* en los callos bombardeados después de 48 horas; B. Callos transgénicos (clonas) después de 6 meses del bombardeo (flechas); C. Planta regenerada a partir de callos transgénicos después de 1 año 6 meses del bombardeo; D. Regeneración de plantas transgénicas en medios suplementados con BA y AIA.

Eady *et al.* (1996) ya habían observado que los callos de cebolla más friables o de crecimiento más lento del cultivar Canterbury Long-Keeper transformados con *Agrobacterium tumefaciens*, fallaban para regenerar plantas o producían brotes hiperhidratados.

Algunos autores afirman que la regeneración de plantas es afectada por el estrés que sufre el tejido después de la transformación, el cual altera los procesos metabólicos relacionados con la diferenciación y protección de las células, causando variaciones en su anatomía, fisiología y bioquímica (Hunold *et al.*, 1994; Kemper *et al.*, 1996; Fehér *et al.*, 2003).

Por su parte Eady y Lister (1998) concluyen que la capacidad de regeneración de plantas vía embriogénesis somática de cebolla está limitada a células que han permanecido por tiempo corto (menos de seis meses) en condiciones *in vitro*. Asimismo, Zheng *et al.* (2001) encontraron que los callos de los cultivares Sturon y Hyton de cebolla perdieron su potencial para producir plantas conforme aumentó el tiempo de cultivo *in vitro*.

Lo anterior pone en evidencia la dificultad que presentan algunos cultivares de cebolla para regenerar plantas transgénicas, aspecto importante a considerar cuando se desea establecer un protocolo de transformación genética, pues podría ser un factor limitante para la aplicación exitosa de esta tecnología.

Sin embargo, aunque en el protocolo para la regeneración *in vitro* de cebolla, reportado con anterioridad (Quintana-Sierra *et al.*, 2005), se obtuvieron ocho plantas promedio por explante, no fue posible igualar esa respuesta en plantas transgénicas. Es probable que el potencial para producir plantas se perdiera a medida que los callos

cultivados *in vitro* permanecían más tiempo en cultivo (un año), aunado al estrés ocasionado por la transformación que afectó la capacidad de regeneración (Kemper *et al.*, 1996; Fehér *et al.*, 2003).

Análisis molecular del material transformado

Además de evaluar la expresión del gen *gusA* y la capacidad de las células para crecer en presencia de los agentes selectivos, la condición transgénica del material fue confirmada mediante análisis de PCR. Dos de las cuatro clonas presuntamente transgénicas analizadas para detectar la presencia del gen *hph*, amplificaron un fragmento de 1.3 kb (Figura 2.2, carriles 3 y 4) correspondiente a este gen (carril 8 control positivo). Por otro lado, las tres clonas ensayadas para el gen *hph* amplificaron un fragmento de 420 pb, que correspondió al gen *gusA* (Figura 2.3, carriles 2, 3, 4, 5, 6 y 7).

La transferencia de genes a la planta de cebolla se ha llevado a cabo, principalmente, utilizando *Agrobacterium tumefaciens* como vehículo y embriones inmaduros como explante (Eady *et al.*, 1996; Eady *et al.*, 2000 y 2003; Zheng *et al.*, 2001; Marinangeli *et al.*, 2003).

En la presente investigación se estableció un protocolo de transformación genética por medio de biobalística y de callos embriogénicos como tejido blanco. El haber recuperado clonas transgénicas mediante este protocolo, demuestra que tanto las condiciones de bombardeo como el tipo de células blanco usadas fueron las adecuadas y que estos factores juegan un papel fundamental en el establecimiento de un protocolo de transformación. La importancia de emplear callos embriogénicos para

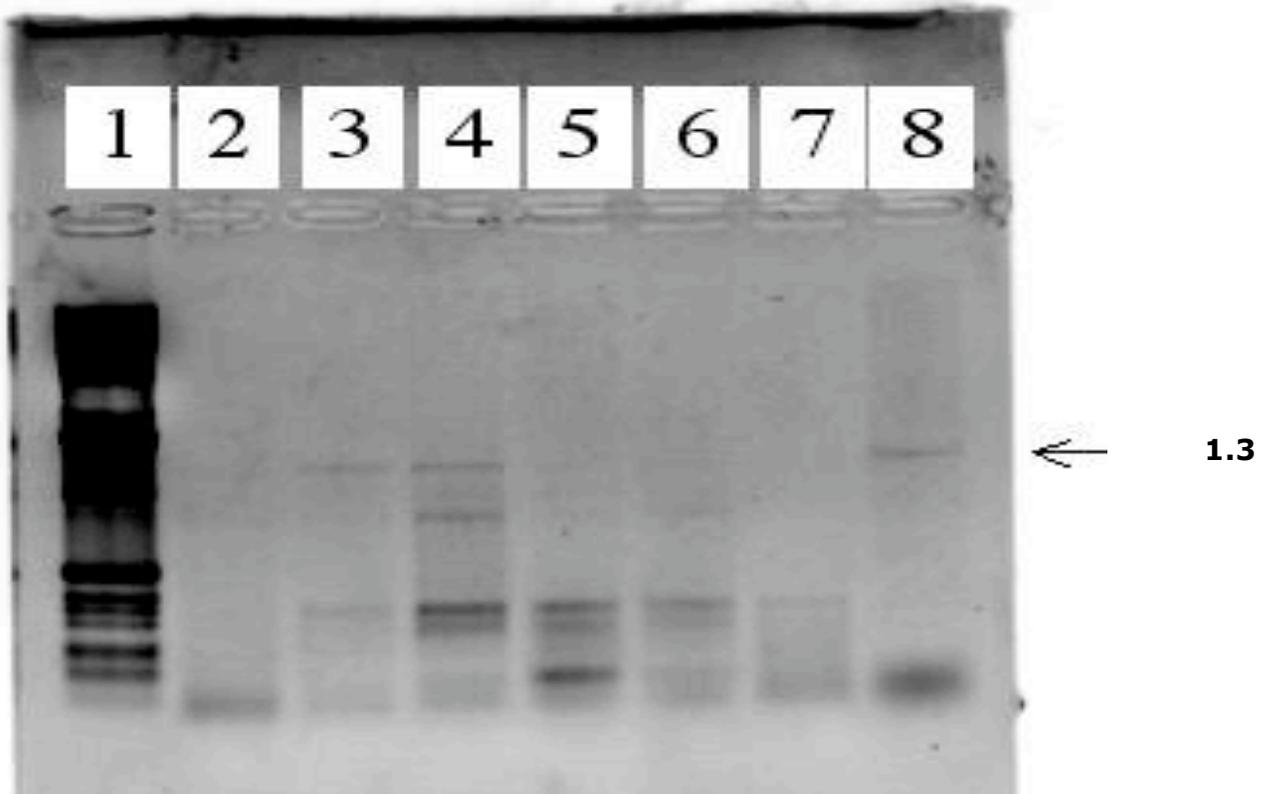


Figura 2.2. Amplificación PCR para detectar el gen *hph* en las células bombardeadas. Carril 1, marcador de peso molecular. Carriles 2, 3, 4 y 5, DNA de callos de cebolla bombardeados con los plásmidos pWRG1515/pRDTAS, pWRG1515/pODC, pWRG1515/pODC y pWRG1515/pRDTAS, respectivamente. Carriles 6 y 7, DNA de callos de cebolla no bombardeados. Carril 8, DNA de papaya transformada con el plásmido pWRG1515 (control positivo).

desarrollar sistemas de transformación exitosos ya había sido reconocida por otros autores (Arencibia *et al.*, 1998; Eady *et al.*, 2000; Robledo-Paz *et al.*, 2004)

La presencia de los genes *hph* y *gusA* en las células de cebolla bombardeadas y la marcada expresión del gen *gusA* detectada en los callos del cultivar Cristal, abre la posibilidad de emplear esta metodología, para introducir en los cultivares de cebolla que se siembran en nuestro país, genes que les confieran características de interés agronómico.

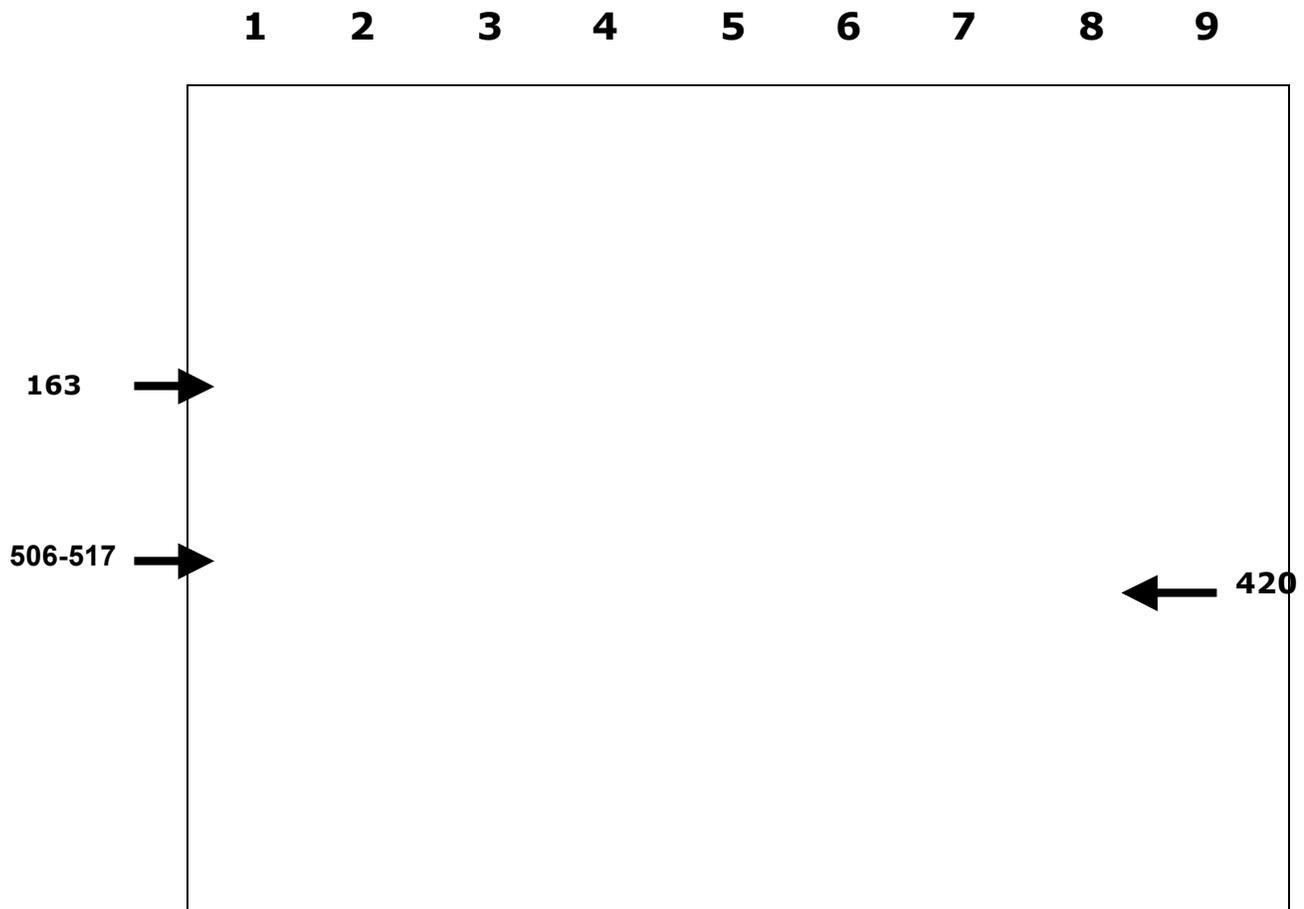


Figura 2.3. Amplificación PCR para detectar el gen *gusA* en los callos bombardeados. Carril 1, marcador de peso molecular. Carril 2, control positivo (secuencia del gen *gusA* de 420 pb). Carriles 3 al 8, DNA de callos de cebolla bombardeados con los plásmidos: p1515/pRDTAS (3, 4); pWRG1515/pODC (5, 6); pWRG1515/pRDTAS (7, 8). Carril 9, control negativo (agua destilada).

2.6. CONCLUSIONES

Es factible la transformación genética de la variedad Cristal mediante el bombardeo de callos embriogénicos con los plásmidos pWRG1515/pRDTAS y pWRG1515/pODC. Las clonas transgénicas obtenidas mostraron alta expresión del gen *gusA*. Las plantas transgénicas regeneradas mostraron hiperhidratación y hojas anormales.

2.7. LITERATURA CITADA

- Arencibia, A. D., E. R. Carmona, P. Tellez, M. T. Chan, S. M. Yu, L. E. Trujillo and P. Oramas. 1998. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Research* 7: 213-222.
- Biddington, N. L. 1992. The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant Growth Regulation* 11: 173-187.
- Cabrera-Ponce, J. L., L. López, N. Assad-García, C. Medina-Arévalo, A. M. Bailey and L. Herrera-Estrella. 1997. An efficient particle bombardment system for the genetic transformation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Plant Cell Reports* 16: 255-260.
- Chen, L., S. Zhang, R. N. Beachy and C. M. Fauquet. 1998. A protocol for consistent, large-scale production of fertile transgenic rice plants. *Plant Cell Reports* 18: 25-31.
- Christou, P., T. L. Ford and M. Kofron. 1991. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/Technology* 9: 957-962.
- Chu, C. C., C. C. Wang, C. S. Sun, C. Hsu, K. C. Yin, C. Y. Chu and F. Y. Bi. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica* 18: 659-688.

- Eady, C. C., C. E. Lister, Y. Suo and D. Schaper. 1996. Transient expression of *uidA* constructs in *in vitro* onion (*Allium cepa* L.) cultures following particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated ADN delivery. *Plant Cell Reports* 15: 958-962.
- Eady, C.C. and C. E. Lister. 1998. A comparison of four selective agents for use with *Allium cepa* L. immature embryos and immature embryo-derived cultures. *Plant Cell Reports* 18: 117-121.
- Eady, C.C., R. J. Weld and C. E. Lister. 2000. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and transgenic-plant regeneration of onion (*Allium cepa* L.). *Plant Cell Reports* 19: 376-381.
- Eady, C.C., D. Sheree, J. Farrant, J. Reader and F. Kenel. 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and regeneration of herbicide resistant onion (*Allium cepa*) plants. *Annals of Applied Biology* 142: 213-217.
- Fehér, A., T. P. Pasternak and D. Dudits. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 201-228.
- Fritsch, R. M. and N. Friesen. 2002. Evolution, Domestication and Taxonomy. *In*: H.D. Rabinowitch and L. Currah (eds.). *Allium Crop Science: recent advances*. CABI Publishing, New York, U. S. A. pp: 5-30.
- Hanelt, P. 1990. Taxonomy, evolution and history. *In*: H. D. Rabinowitch, and J. L. Brewster (eds.). *Onions and Allied Crops*. Vol 1 CRC Press. Boca Raton. FL, USA. pp: 1-27.

- Hernández-Livera, A., J. A. Estrada-Gómez, A. Juárez-De la Cruz y O. J. Ayala-Garay. 1999. Influencia de la fertilización y del ambiente de almacenamiento en la calidad de semilla de cebolla. *Revista Fitotecnia Mexicana* 22: 87-97.
- Hunold, R., R. Bronner, G. Hahne. 1994. Early events in microprojectile bombardment: cell viability and particle location. *Plant Journal* 5: 593-604.
- Jeong, C.-S., D. Chakrabarty, E.-J. Hahn, H.-L. Lee and K.-Y. Paek. 2006. Effect of oxygen, carbon dioxide and ethylene on growth and bioactive compound production in bioreactor culture of ginseng adventitious roots. *Biochemical Engineering Journal* 27: 252-263.
- Kemper, E. L., M. J. Da Silva and P. Arruda. 1996. Effect of microprojectile bombardment parameters and osmotic treatment on particle penetration and tissue damage in transiently transformed cultured immature maize (*Zea mays* L.) embryos. *Plant Science* 121: 85-93.
- Kihara, M., K. Saeki and K. Ito. 1998. Rapid production of fertile transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) by direct gene transfer to primary callus-derived protoplasts. *Plant Cell Reports* 17: 937-940.
- Kik, C. 2002. Exploitation of wild relatives for the breeding of cultivated *Allium* species. *In: H.D. Rabinowitch and L. Currah (eds.) Allium Crop Science: Recent advances.* CABI Publishing. New York, U. S. A. pp: 81-100.
- Marinangeli, P., B. Deluchi, R. Ríos, P. Franzone y N. Curvetto. 2003. Transformación genética de cebolla mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. <http://www.ediho.es/horticom/temaut/cd/Latinoamérica/cebolla/361.htm>. (Verificado Septiembre, 2007).

- McCabe, D. E., W. F. Swain, B. J. Martinell and P. Christou. 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technology* 6: 923-926.
- McGarvey, P. B. and J. M. Kaper. 1991. A simple and rapid method for screening transgenic plant using the PCR. *Bio/Techniques* 11: 428-432.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- O'Connor-Sánchez, A., J. L. Cabrera-Ponce, M. Valdez-Melara, P. Téllez-Rodríguez, J. L. Pons-Hernández and L. Herrera-Estrella. 2002. Transgenic maize plants of tropical and subtropical genotypes obtained from calluses containing organogenic and embryogenic-like structures derived from shoot tips. *Plant Cell Reports* 21: 302-312.
- Pérez G., M., F. Márquez S. y A. Peña L. 1997. *Mejoramiento Genético de Hortalizas*. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 379 p.
- Quintana-Sierra, M. E., A. Robledo-Paz, A. Santacruz-Varela, M. A. Gutiérrez-Espinosa, G. Carrillo-Castañeda y J. L. Cabrera-Ponce. 2005. Regeneración *in vitro* de plantas de cebolla (*Allium cepa* L.). *Agrociencia* 39: 647-655.
- Robledo-Paz, A., J. L. Cabrera-Ponce., V. M. Villalobos-Arámbula, L. Herrera-Estrella and A. E. Jofre-Garfias. 2004. Genetic transformation of garlic (*Allium sativum* L.) by particle bombardment. *HortScience* 39: 1208-1211.
- SAGARPA. 2008. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México D.F. <http://www.sagarpa.siap.gob.mx>. (Verificado Noviembre, 2008).

- Sanford, J. C., M. J. DeVit, J. A. Russell, F. D. Smith, P. R. Harpending, M. K. Roy and S. A. Johnston. 1991. An improved, helium-driven biolistic device. *Technique* 3: 3-16.
- Santamaria, J. M., K. P. Murphy, C. Leifert and P. J. Lumsden. 2000. Ventilation of culture vessels. II. Increased water movement rather than reduced concentrations of ethylene and CO₂ is responsible for improved growth and development of *Delphinium in vitro*. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 75: 320-327.
- Shure, M., S. Wessler and N. Fedoroff. 1983. Molecular identification and isolation of the waxy locus in maize. *Cell* 35: 225-233.
- Suga, M., I. Kusanagi and T. Hatakeyama. 2003. High osmotic stress improves electrotransformation efficiency of fission yeast. *FEMS Microbiology Letters* 225: 235-239.
- Tomes, D. T., M. C. Ross and D. D. Songstad. 1995. Direct DNA transfer into intact plant cells via microprojectile bombardment. *In: Gamborg O. L. and G. C. Phillips. (eds.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods. Springer Lab Manual. Spring-Verlag, Berlin. Germany. pp: 197-123.*
- Williams, J., D. A. C. Pink and N. L. Biddington. 1990. Effect of silver nitrate on long-term culture and regeneration of callus from *Brassica oleracea* var. *gemmifera*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 21: 61-66.
- Zheng, S., L. Khrustaleva, B. Henken, E. Sofiari, E. Jacobsen, C. Kik, and F. A. Krens. 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Allium cepa* L.: the production of transgenic onions and shallots. *Molecular Breeding* 7: 101-115.

Zheng, S. J., B. Henken, F. A. Krens and C. Kik. 2004. The development of a reproducible *Agrobacterium tumefaciens* transformation system for garlic (*Allium sativum* L.) and the production of transgenic garlic resistant to beet armyworm (*Spodoptera exigua* Hübner). *Molecular Breeding* 14: 293-307.

Zobayed, S. M. A., J. Armstrong and W. Armstrong. 2001. Micropropagation of potato: evaluation of closed, diffusive and forced ventilation on growth and tuberization. *Annals of Botany* 87: 53-59.

2.10. ANEXO

1. Preparación del sustrato X-gluc.

1. Pesar 50 mg de X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico) y disolver en 1 mL de DMSO (dimetilsulfoxido).
2. Aparte preparar 100 mL de amortiguador de fosfatos 0.5 M pH 7.0:
 1. Fosfato de sodio pH 7.0, 100 mM
 2. EDTA pH 8.0, 10 mM
 3. Ferrocianuro de potasio 0.5 mM
 4. Tritón X 100 al 0.1 %
 5. Disolver y aforar a 100 mL y ajustar a pH 7.0
3. Agregar el x-gluc disuelto en DMSO al amortiguador de fosfatos, esterilizar por ultrafiltración y guardar la solución a 4 °C.

2. Preparación de las partículas de tungsteno

Método de acuerdo a Tomes *et al.* (1995), modificado por Cabrera Ponce *et al.* (1997)

1. Se pesan 60 mg de partículas de tungsteno M10 (0.73 μm).
2. Se resuspenden en 2 mL de HNO_3 0.1N y se sonicán por 20 minutos.
3. Centrifugar a 12,300 g durante 2 minutos.
4. Retirar el sobrenadante y resuspender en 1mL de etanol concentrado, sonicar brevemente.
5. Centrifugar a 12,300 g por 2 minutos.
6. Retirar el sobrenadante y resuspender en 1 mL de agua desionizada estéril.
7. Separar alícuotas de 250 μL de la solución de tungsteno, resuspenderlas en 750 μL con agua desionizada estéril. La concentración final de tungsteno en cada tubo es de 15 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$.

8. Almacenar a -20°C

3. Recubrimiento de los microproyectiles

Método de Tomes *et al.* (1995) modificado por Cabrera Ponce *et al.* (1997).

1. Se colocan en un tubo ependorff 50 μL de micropartículas de tungsteno (750 μg), 5 μg de ADN de cada plásmido, 50 μL de CaCl_2 2.5 M y 20 μL de espermidina base libre 0.1 M.
2. La mezcla se sonica por 10 segundos hasta que las micropartículas se distribuyan en forma homogénea.
3. Centrifugar por 10 segundos a 12,300 *g*.
4. Retirar el sobrenadante.
5. Agregar 400 μL de etanol concentrado para lavar las partículas.
6. Centrifugar por 10 segundos a 12,300 *g*.
7. Retirar el sobrenadante.
8. Agregar 60 μL de etanol concentrado.
9. Sonicar por 3 segundos.
10. Colocar 10 μL de la mezcla en cada membrana de Kapton (macroacarreador) y dejar secar.

4. Extracción de ADN vegetal.

A) Método de extracción de Shure *et al.* (1983)

- 1) Se colocan 150 mg de tejido en tubos ependorff de 1.5 mL
- 2) Se congelan con nitrógeno líquido y se muelen utilizando una varilla de vidrio.
- 3) Añadir 500 μL de buffer de extracción de urea y homogeneizar con la varilla.
- 4) Añadir 500 μL de fenol-cloroformo, para separar los ácidos nucleicos.

- 5) Mezclar con movimientos suaves hasta obtener una sola fase.
- 6) Centrifugar 7 minutos a 12,300 g.
- 7) Transferir la fase acuosa superior y agregar 500 μ L de isopropanol frío y colocar a -4°C durante 1 hora.
- 8) Centrifugar a 12,300 g durante 6 a 7 minutos.
- 9) Decantar el sobrenadante y lavar la pastilla con etanol al 70 % (500 μ L).
- 10) Se centrifuga a 12,300 g por 10 minutos se elimina el sobrenadante y se obtiene una pastilla (es el ADN).
- 11) Se lava nuevamente con etanol al 70 % (500 μ L), centrifugar nuevamente y eliminar el sobrenadante.
- 12) Se seca la pastilla invirtiendo el tubo sobre una superficie de papel absorbente y se resuspende en 100 μ L de agua desionizada estéril para luego almacenar a 4°C .

Buffer de extracción

Urea 7.0 M

Tris-HCl 0.5 M, pH 8.0

EDTA 0.02 M

NaCl 0.35 M

Sarcosina 1 %

Método de McGarvey y Kaper (1991)

En un tubo ependorff de 1.5 mL se colocan 20 mg de tejido y se maceran con nitrógeno líquido (poner en hielo).

- 1) Añadir 400 μ L de buffer de extracción, agitar en el vortex por 10 segundos.
- 2) Calentar la mezcla a 60°C por 1 hora.

- 3) Añadir 400 μL de cloroformo, agitar en vortex.
- 4) Centrifugar 5 minutos a 12,000 rpm.
- 5) Transferir la fase acuosa superior y agregar el mismo volumen de isopropanol, enfriar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos
- 6) Se centrifuga a 12,000 rpm por 10 minutos.
- 7) Decantar el líquido y lavar la pastilla con etanol al 70 % (150 μL).
- 8) Se centrifuga a 10,000 rpm por 5 minutos se decanta el líquido y se obtiene una pastilla (es el ADN).
- 9) Se lava nuevamente con etanol al 100 % y se centrifuga, eliminando el sobrenadante.
- 10) Se seca la pastilla invirtiendo el tubo sobre papel secante, se resuspende en 20 mL de agua desionizada estéril y se almacena a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

Buffer de extracción

Para preparar 200 mL

CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio) 1 %	2 g
Tris-HCl 1M pH 8.0 (50 mM)	10 mL
EDTA 0.5 M	4 mL
NaCl 0.7 M	8.2 g
PVP (polivinil pirrolidona) 40 0.5 M	1 g
Agua destilada cantidad necesaria para	200 mL

Se esteriliza en autoclave durante 20 minutos

Agregar 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de mercaptoetanol al buffer antes de usar.

CONCLUSIONES GENERALES

Se estableció un sistema de regeneración *in vitro* a partir de puntas de raíz que permitió obtener plantas y microbulbos de cebolla de las variedades Cristal y El Toro en cinco meses.

La regeneración de plantas estuvo en función del genotipo, siendo de la variedad Cristal el que mostró mejor respuesta.

Se logró la transformación genética de la variedad Cristal mediante biobalística y los callos recobrados mostraron expresión del gen *gusA*, aún después de 12 meses del bombardeo de partículas.

La co-transformación de los callos embriogénicos de la variedad Cristal con los plásmidos pWRG1515/pRDTAS y pWRG1515/pODC permitieron obtener clones transgénicas.

Las plantas transgénicas regeneradas de la variedad Cristal mostraron hojas hiperhidratadas y deformes.