



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



# **Establecimiento de un sistema de propagación *in vitro* de *Allium sativum* L.**

## **TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por el bachiller Michelle Ameruoso Leiva como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor: Dra. Teresa Edith Vargas

Caracas, Octubre 2018

---

# TABLA DE CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>iv</b>
<b>II. ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>vii</b>
<b>III. ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>viii</b>
<b>IV. ABREVIATURAS</b>	<b>ix</b>
<b>V. RESUMEN</b>	<b>x</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>14</b>
<i>DESCRIPCIÓN BOTÁNICA</i>	14
Taxonomía	14
Morfología general	14
<i>IMPORTANCIA ECONÓMICA</i>	17
Cultivo a nivel mundial	18
Cultivo a nivel nacional	19
<i>CULTIVO TRADICIONAL</i>	19
<i>CULTIVO IN VITRO</i>	22
Aplicaciones y ventajas	23
Rutas del cultivo in vitro	23
Etapas de la propagación in vitro	24
Micropropagación a partir de meristemas	24
Trabajos sobre micropropagación en Venezuela	26
Multiplicación de brotes	28
Bulbificación <i>in vitro</i>	29
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
<i>OBJETIVO GENERAL</i>	32
<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	32
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>33</b>
<i>MATERIAL VEGETAL</i>	33
<i>MÉTODOS</i>	33
<i>Medios de cultivo</i>	33
<i>Siembra</i>	34
<i>Condiciones de cultivo in vitro</i>	34
Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i>	35
Bulbificación <i>in vitro</i>	36
Etapa de multiplicación	36
Multiplicación a partir de brotes	36
Multiplicación a partir de bulbos	37
<i>Observaciones</i>	38
Aclimatación	38
Estudio morfo-anatómico	38
Análisis de resultados	39
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>40</b>
<i>ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO IN VITRO</i>	40
<i>ETAPA DE BULBIFICACIÓN</i>	47
<i>Medio con fitohormonas y alta concentración de sacarosa</i>	47
<i>Medio sin fitohormonas y alta concentración de sacarosa</i>	51

<i>ETAPA DE MULTIPLICACIÓN</i>	54
<i>Multiplicación a partir de brotes</i>	54
<i>Multiplicación a partir de segmentos de bulbos</i>	59
<i>ACLIMATACIÓN</i>	65
<i>CARACTERIZACIÓN MORFO-ANATÓMICA</i>	68
Edad 1	68
Edad 2 y 3	69
Edad 4	70
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>73</b>
<b>7. FINANCIAMIENTO</b>	<b>75</b>
<b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>76</b>

## AGRADECIMIENTOS

*Por supuesto, son varias las personas a las que quiero agradecerles su apoyo y ayuda durante estos casi dos años de constante trabajo. A mi familia, mis amigos y a mis nuevos amigos.*

*Trabajar en este proyecto ha sido una experiencia enriquecedora, que probablemente no hubiese sido posible de no ser por el financiamiento de la Corporación para el Desarrollo Científico y tecnológico (CODECYT), por lo que agradezco la oportunidad de ser parte de esta iniciativa. Como científico en formación, es importante entender el poder y alcance del conocimiento que generamos.*

*Quiero agradecer a la profesora Eva de García por permitirme usar los espacios del Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Al Profesor Héctor Blanco por su perseverancia y siempre buena disposición ante mis dudas. De igual forma manifiesto mi gratitud hacia la Profesora Maira Oropeza quien, junto con Los Profesores Alexander Laurentín y Alicia Cáceres, dirige este proyecto.*

*Me gustaría aprovechar estas líneas, para agradecer a la Profesora Edith la oportunidad de haber trabajado bajo su tutoría.*

*La realidad, es que la compleja situación económica, política y social en la que vivimos actualmente, resulta muchas veces desalentadora y difícil de manejar. En consecuencia, ser un estudiante en este tiempo, en ocasiones pierde su encanto. Nos vemos tan afectados que, por un momento, dejamos de disfrutar esta experiencia única que es ser un estudiante en la Casa que Vence las Sombras. Entonces, llegamos a la encrucijada a la que muchos nos enfrentamos; surge la gran pregunta que, muchas veces en silencio, nos hacemos llenos de frustración: ¿sigo estudiando? o ¿será que no sirvo para esto?.*

*Sin embargo, algunos tenemos la fortuna, de toparnos en nuestro camino justo en el momento crítico, con profesionales admirables con la vocación de educar. Mi fortuna fue usted Profe.*

*Para los que no la conocen, sepan que para la Profesora Edith, sus estudiantes son la oportunidad perfecta de transmitir sus conocimientos; la oportunidad de darle, a unos*

*jóvenes inexpertos pero dispuestos, el impulso definitivo para que surjan como profesionales. La verdadera fortuna es que, mientras todo eso ocurre, se toma la molestia de conocer a cada uno de esos jóvenes. Así que gracias Profe, por tomarse ese tiempo.*

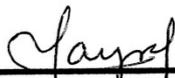
*Por último quisiera mostrar mi apoyo y admiración a todos aquellos futuros Ucevistas, esos valientes que pese a todas las dificultades, deciden seguir estudiando. De igual forma, rindo homenaje a todos aquellos estudiantes que, tristemente, ya no están con nosotros. Este trabajo es solo una pequeña muestra de lo que somos capaces de lograr. Porque, el verdadero motivo por el que continuamos, es que aún bajo circunstancias adversas, creemos en nuestro país.*

*Finalizo este escrito con la esperanza de que más estudiantes, tengan la oportunidad de vivir una experiencia tan o mas enriquecedora que la mía. En nuestras manos están todas las herramientas que Venezuela necesita, y espero que algún día el sacrificio de todos los que creemos en nuestro país finalmente rinda frutos.*

**DEL EXÁMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE  
GRADO DEL BR. MICHELLE AMERUOSO LEIVA**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del Br. Michelle Ameruoso Leiva, portadora de la cédula de identidad CI: V-21.015.895, titulado “**Establecimiento de un sistema de propagación *in vitro* de *Allium sativum* L.**” para optar al título de Licenciado en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos, lo consideramos **APROBADO**.

Para dar de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 16 días del mes de Octubre del año 2018, dejando constar que la Profa. Teresa Edith Vargas actuó como coordinadora del jurado examinador.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Maira Oropeza

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Héctor Blanco

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Teresa Edith Vargas  
(Tutor-Coordinador)

## II. ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Composición de los medios de cultivo de las distintas etapas de propagación *in vitro* de ajo. **34**
- Tabla 2.** Efecto del medio M1 en la respuesta de los meristemas de ajo provenientes de las dos localidades hacia la formación de brotes y raíces. Grupo 1 = Mucuchíes, Grupo 2 = El Molino. **41**
- Tabla 3.** Efecto de medios de cultivo con y sin suplemento hormonal (M1 y M0) sobre la respuesta de meristemas de ajo, hacia la brotación y formación de raíces. Grupo 1 = Mucuchíes. **42**
- Tabla 4.** Efecto del 2ip ( $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) y una alta concentración de sacarosa en el medio de cultivo, sobre la bulbificación en vitroplantas de ajo obtenidas por micropropagación. Grupo 1 = Mucuchíes, Grupo 2 = El Molino. **48**
- Tabla 5.** Efecto de una alta concentración de sacarosa en el medio de cultivo, sobre la bulbificación en vitroplantas de ajo obtenidas por micropropagación. Grupo 1 = Mucuchíes, Grupo 2 = El Molino. **51**
- Tabla 6.** Efecto del suplemento hormonal del medio de cultivo, sobre la formación de brotes *de novo* en vitroplantas de ajo obtenidas por micropropagación a partir de brotes. Grupo 1 = Mucuchíes. **55**
- Tabla 7.** Efecto del suplemento hormonal en el medio de cultivo sobre la formación de brotes *de novo* a partir de segmentos de bulbos de ajo obtenidos *in vitro*. Grupo 1 = Mucuchíes. **60**
- Tabla 8.** Efecto de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo sobre la brotación y regeneración de segmentos de bulbos obtenidos *in vitro*. Grupo 1 = Mucuchíes. **63**

### III. ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Material vegetal proveniente de la localidad de Mucuchíes, Edo. Mérida. **A)** Bulbos o cabezas de ajo enteras. **B)** Bulbillos o dientes. **35**
- Figura 2.** Micropropagación a partir de meristemas de ajo correspondientes al grupo 1 en medio M1. **A)** Meristema aislado y sembrado en medio de cultivo. Brotes transcurridos **B)** 7 días, **C)** 15 días y **D)** 30 días. **43**
- Figura 3.** Bulbificación en vitroplantas de ajo del grupo 1 en medio M2A. **A)** Inicio de la formación de los bulbos a los 30 días de cultivo. **B)** Bulbos formados luego de 60 días. **C y D)** Explantes mostrando bulbificación múltiple. **48**
- Figura 4.** Bulbificación en vitroplantas de ajo del grupo 1 en medio M2B. **A)** Formación de bulbo a los 60 y **B)** 90 días de cultivo. **52**
- Figura 5.** Multiplicación de brotes de ajo del grupo 1. **A)** Formación de brotes *de novo* luego de 70 días de cultivo en medio M3 y **B)** 30 días en medio M1. **56**
- Figura 6.** Multiplicación a partir de segmentos de bulbos formados *in vitro*. **A y B)** Brotes formados en medio M4 y **C y D)** en medio M0 o control a los 30 días de cultivo. **E y F)** Segmentos de bulbos en medio M4 que no formaron brotes. **61**
- Figura 7.** Vitroplantas de ajo con bulbos formados *in vitro*, mantenidas en condiciones de vivero luego de 15 días. **67**
- Figura 8.** **A)** Corte longitudinal de vitroplantas de ajo sin evidencia de bulbificación. **B)** La tinción de la muestra permite detallar la vascularización en la base del explante (va). **68**
- Figura 9.** Bulbificación en vitroplantas de edad 2 y 3. **A)** Corte longitudinal mostrando los dientes en desarrollo (di) y la vascularización del tallo (va) visto bajo lupa. **B)** Cortes transversales mostrando tres dientes en desarrollo (di) y paquetes de haces vasculares (hva) (100x). **C)** Detalle de la hoja de reserva (hr) en muestras teñidas (100x). **70**
- Figura 10.** Bulbificación en vitroplantas de edad 4. **A)** Corte longitudinal, visto bajo lupa, mostrando un único diente desarrollo con meristema (me) rodeado por la hoja de reserva (hr). **B y C)** Corte transversal mostrando detalle del meristema (me) y la hoja de reserva (hr) que lo rodea, y el tallo verdadero (ta) (100x). **72**

## IV. ABREVIATURAS

**2,4-D:** ácido 2,4 diclorofenoxiacético

**2ip:** 2-isopentilamina

**4PU30:** N-(2-cloro-4-piridil-N'-fenilurea)

**AIA:** ácido indolacético

**ANA:** ácido naftalenoacético

**B5:** sales de Gamborg

**BA:** benciladenina

**CG-MS:** cromatografía de gas-Espectrometría de masas

**DBS:** sales de Dunstan y Short

**IBA:** ácido indolbutírico

**JA:** ácido jasmónico

**KIN:** cinetina

**MS:** sales de Murashige y Skoog (1962)

**TDZ:** thidiazuron

**Z:** zeatina

## V. RESUMEN

El ajo (*Allium sativum* L.) es una planta herbácea perenne, perteneciente a la familia de las Amaryllidaceae, apreciada por sus propiedades organolépticas y los múltiples beneficios para la salud que brinda su consumo. Sin embargo, la reproducción estrictamente vegetativa de este cultivo, junto con la susceptibilidad a una amplia gama de patógenos, hacen de esta especie un candidato adecuado para el cultivo *in vitro*. El presente trabajo forma parte de un proyecto nacional para la producción de semillas certificadas, y tuvo como objetivo establecer un sistema de propagación *in vitro* de *Allium sativum* L. . El establecimiento del cultivo *in vitro*, fue posible gracias a la siembra de meristemas aislados de bulbos provenientes de dos localidades del Edo. Mérida, para lo cual se emplearon dos medios MS, el primero con 0,2 mg.L<sup>-1</sup> ANA y 2ip 0,5 mg.L<sup>-1</sup> (M1) y el segundo sin suplemento hormonal (M0), obteniéndose brotes en ambos medios de cultivo. Posteriormente, la bulbificación fue inducida en medio MS con una mayor concentración de sacarosa (9 %) en combinación con 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de 2ip o sin suplemento hormonal (M2A y M2B). Ambos medios promovieron la bulbificación, aunque la producción de más de un bulbo/explante estuvo asociada a la adición de citocinina (M2A). En pro de aumentar el promedio de brotes/explante, se mantuvieron brotes en medio MS suplementado con 2,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIA y 5,0 mg.L<sup>-1</sup> de KIN (M3), obteniéndose un promedio de 1,28 brotes/explante. Al sembrar segmentos de bulbos formados *in vitro* en medio MS con 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de BA (M4) el promedio de brotes/explante fue 1,25; aunque al usar medio M2B estos formaron bulbos completos nuevamente. Para la etapa de aclimatación, un grupo de vitroplantas con y sin bulbos formados *in vitro*, fue transferido a un sustrato compuesto por materia orgánica y arena en proporción 3:1, obteniéndose una mayor supervivencia en plantas con bulbos. Por último, la caracterización morfo-anatómica de los bulbos formados *in vitro* permitió evaluar la ontogenia de los mismos, notándose la formación de bulbos compuestos por un solo diente desarrollado y maduro luego de 60 días en medio para bulbificación.

**Palabras clave:** *Allium sativum* L., cultivo *in vitro*, meristemas, bulbificación.

## 1. INTRODUCCIÓN

El *Allium sativum* L., es una planta herbácea perenne perteneciente a la familia Amaryllidaceae, y dentro de cuyo género (*Allium*) podemos encontrar otras especies de alto interés para el hombre como lo son el *Allium cepa* (cebolla), *A. porrum* (ajoporro), *A. schoenoprasum* (cebollín) y *A. ascalonicum* (chalote) (SendI, 1995).

Parte del ciclo de vida de esta planta incluye la formación de un bulbo, una estructura de almacenamiento de sustancias nutritivas, cuya formación en condiciones naturales se ve favorecida por variaciones en ciertos aspectos ecofisiológicos (días más largos y aumento de la temperatura ambiental) (Mann, 1952; Burba, 2003). Sin embargo, una diferencia importante sobre los cultivos de ajo, en comparación a otras especies de *Allium*, es la forma de reproducción asexual o vegetativa a pesar de que es posible encontrar variedades silvestres capaces de producir inflorescencias (Keller y col., 2013).

Es en esta estructura donde se encuentran compuestos órgano sulfurados y otros compuestos químicos que le confieren sus propiedades organolépticas y farmacológicas. Un caso notorio es la presencia de Alicina, un metabolito secundario formado a partir de la Aliina, cuya actividad antimicrobiana ha sido ampliamente estudiada debido a su eficiencia contra cepas bacterianas de naturaleza entero toxigénica y resistentes a fármacos, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium* sp., *Helicobacter pilory*, entre otros (Cruz y col., 2017).

El consumo de ajo fresco proporciona otros múltiples beneficios para la salud (efecto antioxidante, prevención de arterioesclerosis y derrames cerebrales, disminución de la incidencia de tumores, etc.) lo que ha contribuido con el aumento en la popularidad y demanda de este rubro (SendI, 1995; Helou y Harris, 2007).

Para el año 2016 la producción total de ajo a nivel mundial fue de 26.573.001 toneladas, siendo el principal país productor China con una producción de 21.263.237 toneladas (80% de la producción mundial) y una superficie cultivada de 796.809 hectáreas. En contraste, la producción total en Venezuela para la misma fecha fue de 13.897 toneladas en una superficie total de cultivo de 1.560 hectáreas, esto implica un aporte del 0,1% a la producción mundial de ajo (FAOSTAT, 2017b).

Es importante resaltar que la producción nacional de ajo, ha disminuido significativamente en los últimos años, pasando de una producción total de 18.150 toneladas para el año 2011, a una producción total promedio de 13.278,25 toneladas para el periodo 2012-2016; lo que ha posicionado a Venezuela en el puesto número 39 entre la lista de los 98 países productores de ajo en el mundo según la FAO (FAOSTAT, 2017b).

Considerando la alta demanda de este rubro, la baja tasa de propagación en campo consecuencia de su forma de reproducción (Khan, 2004) y la amplia gama de patógenos a la que esta especie es susceptible, se propone como alternativa la aplicación de biotecnologías las cuales permiten obtener propágulos libres de patógenos en un tiempo menor. Así, esta serie de herramientas, pudiera contribuir con el aumento de la producción nacional.

En este sentido, la micropropagación es una de las técnicas que ha sido ampliamente estudiada en el cultivo *in vitro* de plantas de *A. sativum*. Esta técnica, permite entre otras cosas la propagación masiva de plantas y la clonación de individuos (Jiménez G., 1998; Salisbury y col., 2000) bajo condiciones ambientales conocidas y controladas (George y Debergh, 2008).

Basándose en los motivos antes expuestos, se planteó como objetivo general del presente trabajo establecer un sistema de propagación *in vitro* de *Allium sativum* L. De esta forma, los propágulos obtenidos fueron entregados a los agricultores de las zonas de Mucuchies y El Molino en el Edo. Mérida, los cuales serán utilizados como semillas en la iniciación de cultivos de ajo con la finalidad de promover la actividad agrícola en el país. Este trabajo de investigación se encuentra enmarcado dentro del proyecto de envergadura nacional: “Producción de semilla mejorada y certificada de ajo (*Allium sativum* L.); apio criollo (*Arracacia xanthorrhiza*); fresa (*Fragaria ananassa*); cacao (*Theobroma cacao*); café (*Coffea arabica*) y zanahoria (*Daucus carota*)”, manejado por la Corporación para el Desarrollo Científico y Tecnológico (CODECYT).

## 2. ANTECEDENTES

### DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

#### Taxonomía

*Allium sativum* L., en la taxonomía moderna, pertenece a la clase Monocotyledoneae, subclase Petrosaviidae, orden Asparagales, familia Amaryllidaceae, subfamilia Alliaceae, género *Allium* (UniProt, 2018; ITIS, 2018). Dentro de este género se incluyen más de 400 especies entre las cuales se pueden mencionar, además de *Allium sativum*, algunas otras de alto valor comercial como *Allium cepa* (cebolla), *A. porrum* (ajoporro), *A. schoenoprasum* (cebollín) y *A. ascalonicum* (chalote) (SendI, 1995).

La especie *A. sativum* es considerada una planta oriunda de Asia Central (FDA, 1995), proveniente de las regiones que hoy día conforman las naciones de Irán, Kazakhstan, Kirgizstan, Tadzhiqistan, Turkmenistan, Uzbekistan (Royal Botanic Gardens KEW, 2017; Burba, 2003). Luego fue introducida al resto de Asia y el continente Europeo y posteriormente África y América (FDA, 1995).

#### Morfología general

Las plantas de *A. sativum* se caracterizan por presentar hojas aplanadas y de naturaleza envolvente formadas por una vaina y un limbo, las cuales pueden llegar a medir 50 u 80 cm. A su vez, las vainas de las hojas se superponen formando una estructura cilíndrica que asemeja un tallo, lo que se conoce como pseudotallo, mientras que el tallo verdadero mide unos 5 mm aproximadamente y presenta entrenudos muy cortos. A partir del tallo se

desarrollan las hojas y numerosas raíces adventicias capaces de penetrar hasta una profundidad aproximada de 45 cm (SendI, 1995; FDA, 1995).

Por otro lado, las hojas pueden clasificarse como estériles o fértiles dependiendo de su posición en el eje de crecimiento. De este modo, las fértiles son aquellas internas y en cuyas axilas se encuentran yemas que darán origen a los bulbillos o dientes; mientras que las estériles más externas (de la primera a la quinta generalmente) desempeñarán funciones de protección una vez formado el bulbo (Mann, 1952).

Esta especie herbácea y perenne es de reproducción vegetativa, pues ha perdido su fertilidad debido a la domesticación de los cultivos (Keller y col. 2013). No obstante, se han reportado variedades silvestres de ajo capaces de producir estructuras florales; el fruto de la planta, una cápsula de tres cavidades, puede contener semillas de color negro que pocas veces resultan fértiles (FDA, 1995).

El bulbo del ajo es una estructura subterránea u órgano de reserva, producto de la modificación del cormo, el cual se engrosa permitiendo el almacenamiento de sustancias nutritivas (Roth, 1980). El mismo está compuesto por varios bulbillos o dientes de ajo, los cuales se encuentran unidos por su base y agrupados formando el bulbo o cabeza de ajo. A su vez, tanto los bulbillos como el bulbo se encuentran rodeados por túnicas protectoras (FDA, 1995) las cuales presentan una coloración característica de la variedad cultivada (Burba, 2003). El número de bulbillos que forma la estructura puede variar según la especie (FDA, 1995); en este sentido en cultivares de ajo morado, dependiendo de las condiciones de cultivo, se han obtenido bulbos con 7 a 11 dientes o incluso 22 a 25 dientes por bulbo (Acosta-Rodríguez y col., 2008; Duarte y col., 2010).

Durante la formación del bulbo, pueden diferenciarse cuatro tipos de hojas las cuales cumplen diferentes funciones: de protección, de reserva, de brotación y las hojas verdaderas (Mann, 1952; Burba, 2003). Las hojas o túnicas de protección se encuentran recubriendo cada uno de los dientes así como también al bulbo por completo y se han formado a partir de las hojas estériles, son entonces las hojas más externas y secas.

Luego, las hojas de reserva son láminas de gran grosor y de forma tubular en donde se depositan los materiales de reservas (Mann, 1952), como por ejemplo la fructosana (polímero de fructosa) (Ramírez-Concepción y col., 2016) y la alicina (Córdova, 2010). Estas, a diferencia de las de protección, no presentan lignificación o células con paredes gruesas sino un parénquima uniforme y corresponden a la parte que es utilizada en el mundo culinario (Mann, 1952).

Las hojas de brotación y las verdaderas son similares en aspecto. Las de brotación, se elongan junto con las verdaderas ofreciéndoles protección mientras estas últimas emergen desde el suelo. Presentan una epidermis externa endurecida una vez ha brotado la planta. Las hojas verdaderas son aquellas que se originan a partir del meristema contenido en las hojas tubulares de reserva. Estas decrecen en tamaño a primordios más pequeños a medida que se aproximan al ápice del tallo (Mann, 1952).

## IMPORTANCIA ECONÓMICA

*A. sativum*, es una especie de alto interés comercial en la sociedad actual por su amplio uso en el mundo culinario debido a sus propiedades organolépticas, así como también en la industria farmacológica gracias a sus propiedades medicinales. No obstante, su uso se remonta al antiguo Egipto donde se menciona en el Papiro “Codex Ebers” (1.550 A.C), también es reconocido en la Antigua Roma por Plinio “el Viejo” y Dioscorides y en Grecia por Hipócrates, Aristófanes y Galen; y en la India aparece en el “Manuscrito de Bower” como elemento de la medicina tradicional (450 A.C) (SendI, 1995; Harris y col., 2001).

Los análisis químicos de extractos de ajo, muestran su riqueza en compuestos organosulfurados y en menor proporción carbohidratos (inulina como precursor de la fructosa), celulosa, aminoácidos, proteínas y enzimas, lípidos, vitaminas (C, A, B, etc.) y minerales (Potasio, Calcio, Fósforo, Magnesio, etc.) (FDA, 1995; SendI, 1995; Ramírez-Concepción y col., 2016).

La Aliina se destaca como uno de los compuestos organosulfurados de mayor importancia, puesto que es el principal responsable del olor y sabor característico del ajo al transformarse en Alicina gracias a la actividad catalítica de la enzima Alinasa. Este metabolito secundario, derivado de la cisteína, se relaciona además con las propiedades antisépticas, antibacterianas (tanto bacterias Gram-positivas como Gram-negativas), antifúngicas, antivirales y antiparasitarias que proporciona su consumo (Helou y Harris, 2007; Lanzotti y col., 2013).

Otros beneficios para la salud que aporta el consumo de ajo fresco para el ser humano incluyen: efecto antioxidante, la prevención de arterioesclerosis y derrames cerebrales,

reducción de los niveles de colesterol en sangre, regulación de la hipertensión arterial y desorden vascular, disminución de la incidencia de tumores y el aumento de la tasa de coagulación sanguínea, reducción de malestares gastrointestinales (SendI, 1995; Helou y Harris, 2007). Además, investigaciones recientes sobre el mecanismo de acción de los compuestos químicos intrínsecos del *A. sativum*, han dejado en evidencia que su acción es efectiva en cuanto al mejoramiento del sistema inmune (Harris, 2001).

### **Cultivo a nivel mundial**

Los múltiples beneficios que conlleva el consumo de ajo y su versatilidad culinaria han incrementado la popularidad de este cultivo con el paso del tiempo, lo que se ve reflejado en el aumento significativo de la superficie cultivada y producción de este rubro a nivel mundial desde principio de los años sesenta hasta la actualidad. Así, para el año 1961 la superficie cultivada de ajo correspondía a unas 771.238 hectáreas con una producción de 4.300.697 toneladas, mientras que para el año 2000 era de 1.080.932 hectáreas con una producción de 12.234.225 y para el año 2016 la superficie estimada fue de 1.468.811 hectáreas con una producción de 26.573.001 toneladas (FAOSTAT, 2017a)

Con respecto al año 2016, la lista de los principales países productores a nivel mundial se ve encabezada por China con una producción de 21.263.237 toneladas, lo que representa el 80% de la producción mundial de ajo. Para el mismo año, le sigue la India con una producción de 1.400.000 toneladas, mientras que Corea del Sur se posicionó en el quinto lugar con una producción de 275.549 toneladas quedando por encima de España quien generó unas 170.042 toneladas ubicándose como el décimo país productor. Por otro lado, en Latinoamérica el principal productor para la misma fecha fue Argentina, seguido de Brasil y Perú, quienes

generaron producciones de 149.006, 132.359 y 78.205 toneladas respectivamente (FAOSTAT, 201b).

### **Cultivo a nivel nacional**

Por otro lado, en Venezuela este cultivo se destina principalmente al consumo fresco, siendo los estados de la región Andina (Mérida, Táchira y Trujillo) los principales productores generando el 70 % de la superficie cultivada total; mientras que el porcentaje restante se reparte entre los estados Lara, Aragua, Miranda y Distrito Capital (INIA, 2005; Mujica, 2012).

Para el año 2011 la superficie cultivada fue de 2.012 hectáreas de terreno con una producción de 18.150 toneladas de ajo y un rendimiento aproximado de  $9.020 \text{ kg.ha}^{-1}$ . Mientras que para el año 2012 la superficie cultivada total fue de 1.400 hectáreas con una producción de 12.673 toneladas y un rendimiento similar al anterior. Sin embargo, la producción para el año 2016 fue de 13.897 toneladas con un rendimiento estimado de  $8.908 \text{ kg.ha}^{-1}$ , siendo tanto la producción como el rendimiento menor a los registrados para el año 2015 (14.204 toneladas con un rendimiento de  $8.883 \text{ kg.ha}^{-1}$ ) (FAOSTAT, 2017a).

### **CULTIVO TRADICIONAL**

Los tipos comerciales de ajo pueden ser clasificados de acuerdo primordialmente a la coloración de las túnicas protectoras que rodean al bulbo. Según lo anterior, Burba (2003) menciona los siguientes tipos o variedades comerciales: rosado, morado, violeta, blanco, colorado, castaño. Adicionalmente, pueden clasificarse también según los requerimientos de fotoperíodo, ciclo vegetativo, tamaño de los bulbillos que conforman el bulbo, entre otros

(FDA, 1995). En Venezuela se cultivan dos variedades: ajo blanco o criollo y ajo morado (INIA, 2005).

De cualquier forma, debido a la forma de reproducción vegetativa o asexual del *A. sativum*, el método de siembra en los cultivos tradicionales consiste en la selección de dientes de ajo que han sido separados del bulbo y que son utilizados como semillas (Burba, 2003).

Estas “semillas” atravesarán un ciclo de vida anual o bianual (SendI, 1995), el cual puede dividirse en varias etapas hasta que la planta entra en la etapa final de senescencia: dormancia, brotación, crecimiento, bulbificación y senescencia (Burba, 2003). Cada etapa consta de una serie de cambios anatómico-morfológicos los cuales se ven asociados a factores ambientales como temperatura y fotoperíodo (Mann, 1952).

En primera instancia, las “semillas” deben ser greladas lo que implica un cierto período de tiempo (el cual depende de la variedad) a bajas temperaturas con la finalidad de romper la latencia de la yema apical e inducir su elongación; la brotación y el crecimiento ocurren igualmente a bajas temperaturas e implican el desarrollo de follaje o parte aérea de la planta. Una vez inducida la bulbificación, se inicia el la formación del bulbo, durante el cual la acumulación de material de reserva se ve favorecido por días largos y temperaturas más elevadas hasta que el desarrollo de esta estructura se detiene debido a la senescencia, obteniéndose bulbos en estado maduro adecuados para ser cosechados (Burba, 2003).

La bulbificación es un proceso morfogenético, que resulta de la interacción genotipo-ambiente (Shah y Kothari, 1997 citado por Mujica, 2012). Así, la formación de los bulbillos o dientes, es el resultado de la modificación de las hojas planas y bifaciales las cuales

atraviesan una serie de cambios morfo-anatómicos en pro de la acumulación de sustancias importantes y de reserva.

Además, en pro de obtener un alto rendimiento y buena calidad del producto final cosechado, los suelos cultivados deben ser permeables y compuestos por una mezcla de arcilla y arena (FDA, 1995). Se requiere además una fertilización adecuada con compuestos amoniosulfurosos para favorecer la acumulación de Alicina (SendI, 1995); la disponibilidad de Nitrógeno y otros elementos en el suelo, como el Selenio, también contribuyen a aumentar la calidad nutricional del ajo (Ramírez-Concepción y col., 2016).

Un inconveniente recurrente en los cultivos de ajos, es la susceptibilidad de esta especie al ataque de una amplia gama de patógenos. En presencia de suelos contaminados, las plantas de ajo pueden desarrollar enfermedades causadas por: <sup>1</sup>)hongos como *Sclerotium cepivorum* y *Alternaria porri*, <sup>2</sup>)bacterias como *Pectobacterium carotovorum* antes perteneciente al género *Erwinia* (Hernández-Anguiano y col., 2006), <sup>3</sup>)nemátodos del género *Ditylenchus*, <sup>4</sup>)ciertos insectos como el ácaro de cultivo *Eriophyes tulipae* (INIA, 2005) o <sup>5</sup>)complejos virales Potyvirus como el OYDV (Onion Yellow Dwarf Virus) y el LYSV (Leek Yellow Stripe Virus); Carlavirus como el GCLV (Garlic Common Latent Virus) y el SLV (Shallot Latent Virus) y Allexivirus entre los cuales hay una amplia variedad (Garlic virus-A, -B, -C, -D, -E, -X;Garlic mite-borne Filamentous Virus o GarMbFV) (Pérez-Moreno y col., 2008; Conci y col., 2004).

Estos organismos afectan el normal desarrollo del cultivo y generan sintomatología no deseada en las plantas, como por ejemplo la disminución del peso y diámetro de los bulbos, así como también el número de bulbillos que lo componen (Pérez-Moreno y col., 2008). Las

infecciones producen grandes pérdidas económicas para los agricultores y perjudican los suelos de cultivo debido a su contaminación, pudiendo afectar cultivos posteriores (Meredith, 2008 citado por Pardo y col., 2011).

### **CULTIVO *IN VITRO***

El cultivo de tejidos vegetales consiste en una serie de técnicas que permiten el crecimiento de células, tejidos u órganos vegetales que han sido aislados de una planta madre y transferidos de forma aséptica a medios de cultivo artificiales y de composición química conocida e incubados bajo condiciones de crecimiento controladas (George y Debergh , 2008).

Las técnicas de cultivo *in vitro* se basan en el principio de Totipotencia Celular, término acuñado por primera vez en 1901 por el científico Thomas Hunt Morgan; fue aplicado por primera vez en 1902 por el fisiólogo vegetal Gottlieb Haberlandt, quien tuvo éxito en mantener con vida células vegetales aisladas y sembradas sobre un medio nutritivo y enriquecido con sacarosa (Shahzad y col., 2016). Más adelante en 1939 los investigadores Nobécourt, Gautheret y White lograron con éxito el primer cultivo *in vitro* usando tejidos aislados de plantas de zanahoria y tabaco respetivamente (Mateo-Sagasta, 1990; Shahzad y col., 2016).

Este principio hace referencia a la capacidad de regeneración de un organismo completo a partir de una célula vegetal aislada, lo que es posible debido a que cualquier célula vegetal contiene información genética idéntica a la planta madre y necesaria para su desarrollo y normal funcionamiento (Calva C. y PérezV., 2005).

### ***Aplicaciones y ventajas***

La importancia de estas técnicas radica tanto en su amplia gama de aplicaciones, como en las ventajas que conlleva su práctica. Entre sus aplicaciones se pueden nombrar: la propagación masiva de plantas, clonación de individuos, obtención de plantas libres de patógenos, producción de semillas sintéticas, conservación de germoplasma (individuo, grupo de individuo o clones representativos de un genotipo, variedad, especie o cultivo, que forma parte de una colección. FAO, 2001), obtención de metabolitos secundarios, ingeniería genética de plantas, producción de haploides y estudios fisiológicos, anatómicos, morfológicos, entre otros (Jiménez, 1998a; Salisbury y col., 2000). Aunque el costo de producción puede ser elevado, algunas de las ventajas más importantes son la reducción en el tiempo de ciertos procesos fisiológicos de especies de interés comercial, el control continuo sobre las condiciones ambientales, el control fitosanitario sobre los explantes, el almacenamiento en espacios reducidos y la facilidad de transporte (George y Debergh, 2008).

### ***Rutas del cultivo in vitro***

Existen varias vías o estrategias en el cultivo *in vitro* de plantas, entre las cuales se pueden mencionar: **1)** la micropropagación a partir de yemas, meristemas o microesquejes; **2)** la organogénesis o formación de órganos *de novo* gracias al desarrollo de meristemoides en el explante inicial directamente o a partir de callo formado previamente (indirecta); **3)** la embriogénesis somática directa cuando ocurre la formación de embriones a partir de células somáticas (sin fusión de gametos); también puede ocurrir la embriogénesis somática indirecta si hay formación previa de callo (Krikorian, 1993).

### ***Etapas de la propagación in vitro***

Por otro lado, las rutas del cultivo *in vitro* atraviesan 5 etapas o fases: fase 0 o preparativa, fase 1 o establecimiento del cultivo, fase 2 o multiplicación, fase 3 o enraizamiento y fase 4 o aclimatación.

La fase 0 consiste en la selección y preparación de la planta madre tomando en cuenta la variedad a trabajar, su estado fitosanitario y tratamientos previos que sean necesarios para optimizar el éxito de la fase siguiente. La fase 1 corresponde a la iniciación o establecimiento aséptico del cultivo. La fase 2, tiene como finalidad obtener el mayor número posible de propágulos con la capacidad de diferenciarse en individuos adultos. Luego la fase 3, consiste en inducir la formación de raíces con el objetivo de conseguir plantas capaces de sobrevivir en condiciones *ex vitro* (medio ambiente). Por último, la fase 4 comprende la transferencia de las plantas obtenidas *in vitro* a condiciones *ex vitro* (Krikorian, 1993).

### **Micropropagación a partir de meristemas**

Un meristema, puede definirse como un tejido vegetal específico (pero indiferenciado) en el que las células son capaces de dividirse activamente en tejidos especializados (FAO, 2001). La importancia en el uso de meristemas como explante inicial en la micropropagación radica en el logro del saneamiento de un tejido o la obtención de propágulos libre de virus y demás patógenos. Esto se debe a la alta tasa de división celular del tejido meristemático (que supera a la de los patógenos), la ausencia de sistema vascular diferenciado que facilite el transporte de patógenos y la elevada concentración de auxinas que inhiben la reproducción de los mismos (Conci, 2004; Panattoni y col., 2013; Manjunathagowda y col., 2017).

Por otro lado, Jiménez (1998) indica que el término “cultivo de meristemas” hace referencia al uso de fragmentos de tejidos que miden entre 0,1 a 0,5 mm y que abarca el domo meristemático más los primeros primordios foliares. En consecuencia, explantes que superen los 0,5 mm, deben denominarse ápices.

En algunos casos, la ausencia de sintomatología no determina la ausencia de infección viral en la planta, por lo que para asegurar la obtención de propágulos sanos es recomendable el cultivo *in vitro* de meristemas (Pérez-Moreno L. y col., 2008).

Se considera además, que las plantas obtenidas a partir de esta micropropagación, son clones de la planta madre debido a la baja tasa de variación somaclonal que resulta de este proceso en comparación a las otras rutas de propagación *in vitro* (embriogénesis directa o indirecta y organogénesis directa o indirecta) (Conci, 2004). Aunque Gimenez y col. (2016) reportaron variación somaclonal significativa en cultivos *in vitro* de meristemas de ajo al usar termoterapia. También es posible, gracias a la micropropagación, variar el número de brotes formados a partir de cada explante sembrado al modificar tanto el balance hormonal de los medios de cultivo, como el número de subcultivos practicados (Nagakubo y col., 1997).

En el caso del ajo, su forma de reproducción asexual o vegetativa y la susceptibilidad a una amplia gama de patógenos, hacen de este cultivo un candidato adecuado para la práctica de micropropagación de meristemas con la finalidad de obtener semillas sanas y aptas para su posterior cultivo en campo.

En Venezuela son pocos los trabajos de investigación que se han realizado sobre la propagación *in vitro* de *Allium sativum* L. usando como técnica la micropropagación de meristemas o ápices.

#### ***Trabajos sobre micropropagación en Venezuela***

Como primera referencia se nombra el trabajo especial de grado realizado por González (1984) quien estableció un sistema de micropropagación para ajo de la variedad Morada a partir de meristemas para la obtención de plantas libres de virus. El autor evaluó la respuesta de explantes iniciales de distintos tamaños (0,1 a 3,0 mm), indicando que la formación de brotes *de novo* (propagación múltiple) depende del tamaño de dicho explante. En todos los casos, el medio óptimo de cultivo correspondió al medio basal BDS o Dunstan y Short, suplementado con ANA y 2-ip (0,2 y 0,5 mg.L<sup>-1</sup>). Adicionalmente indica la formación de bulbos en alguno de los explantes. Por último, el porcentaje de erradicación de virus fue de 86,7% en plantas obtenidas a partir de la micropropagación de meristemas.

De García y Vargas (2000), realizaron la micropropagación de meristemas de ajo de la variedad blanco proveniente de cinco países (Argentina, Venezuela, México, Portugal y España), para la obtención de plantas libres de patógenos. Empleando las sales de Murashige y Skoog 1962 (MS) y comparando distintas combinaciones de BA y ANA o ANA y 2-ip, encontraron que los mejores resultados con respecto a brotación y formación de bulbos se obtuvieron en medios suplementados con ANA y 2-ip (0,2 y 0,5 mg.L<sup>-1</sup>). Se estimaron además, los porcentajes de brotación y formación de bulbos para cada variedad, en el primer caso el más alto correspondió a la variedad proveniente de México (100%) y en el segundo la variedad proveniente de Venezuela (72,34%). Con respecto al índice de multiplicación, los más altos se estimaron para las variedades provenientes de México (3,33) y Argentina (3,85).

Mujica y Mogollón (2004) en su trabajo sobre bulbificación *in vitro* del ajo (*Allium sativum* L.), aislaron inicialmente ápices meristemáticos (domo apical más dos primordios foliares) como estrategia para establecer el cultivo *in vitro* inicial. Luego, se evaluó la formación de bulbos *in vitro* en medios del cultivo MS suplementados con distintas citocininas (BA, Z y 2-ip) y concentraciones de sacarosa (3%, 6% y 9%). Todas las citocininas usadas indujeron la formación de bulbos en las vitroplantas luego de 8 semanas de cultivo; sin embargo, solo las vitroplantas cultivadas en medio con 2-ip (2,0 mg.L<sup>-1</sup>) presentaron tendencia hacia la bulbificación múltiple. El efecto individual de la adición de altas concentraciones de sacarosa igualmente indujo la formación de bulbos en las vitroplantas.

Luego Mujica y col. (2008), para realizar el estudio histológico de la formación *in vitro* de bulbos de ajo morado, utilizaron el mismo protocolo del 2004, que permitió la obtención de vitroplantas a partir del cultivo del ápice caulinar (domo meristemático más dos primordios foliares) en medio MS suplementado con ANA y 2-ip (0,1 y 2,0 mg.L<sup>-1</sup>) las cuales posteriormente fueron mantenidas en medio MS suplementado con 2-ip (2,0 mg.L<sup>-1</sup>) y concentración de sacarosa aumentada al 9%. A los 60 días de cultivo, los autores reportaron la formación promedio de 7 dientes por bulbo formado *in vitro*, lo que representa la disposición de 7 semillas a ser usadas en campo luego de su aclimatación.

Pardo y col. (2011), en su trabajo sobre la regeneración *in vitro* de *Allium sativum* L. a partir de segmentos de hojas y raíces por organogénesis indirecta, cultivaron inicialmente ápices con 4 o 6 primordios foliares con la finalidad de obtener vitroplantas libres de patógenos. El porcentaje de brotación fue de 98% y el índice de multiplicación asociado fue igual a 1. Luego, a partir de segmentos de hojas y raíces de tales vitroplantas, se logró la inducción de

formación de callo y la posterior regeneración de brotes. Los resultados permitieron concluir que el mejor protocolo para la inducción de callo correspondió al cultivo de segmentos de raíces en medio MS suplementado con Picloran y 2i-p (1,0 y 1,0 mg.L<sup>-1</sup>), mientras que para la regeneración de brotes el tratamiento óptimo fue el cultivo en medio MS suplementado con KIN y 2,4-D (5,0 y 0,01 mg.L<sup>-1</sup>).

### **Multiplicación de brotes**

El bajo índice de multiplicación del ajo, obtenido a través de la micropropagación de meristemas o ápices, ha llevado a distintos investigadores a estudiar el efecto de distintos medios de cultivos suplementados con diferentes fitohormonas sobre el desarrollo de brotes *de novo* a partir de un explante.

En este sentido, se puede mencionar el trabajo de Carhuaricra y col. (2012) quienes buscaron optimizar la multiplicación *in vitro* de brotes de ajo de la variedad Morado Barranquino. Una vez establecidos los brotes a partir del cultivo de meristemas caulinares (domo meristemático y un primordio foliar), se determinó que la mejor respuesta en cuanto al aumento del índice de multiplicación se obtuvo al mantener las vitroplantas en medio de cultivo MS modificado en macronutrientes y suplementado con AIA y KIN (2,5 y 5,0 mg.L<sup>-1</sup>). Las modificaciones consistieron en un aumento de las siguientes sales: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 255 mg.L<sup>-1</sup>; KNO<sub>3</sub> 5.700 mg.L<sup>-1</sup>; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 440 mg.L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 370 mg.L<sup>-1</sup> y NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 150 mg.L<sup>-1</sup>. El resultado fue un índice de multiplicación estimado igual a 4,79 brotes/explante.

Luciani (2001) en su trabajo de investigación titulado “Estudios de bulbificación en ajo (*Allium sativum* L.) mediante técnicas de cultivo *in vitro* y su posible aplicación en la

producción de ajo semilla”, concluyó que el cultivo de segmentos de brotes (previamente establecidos *in vitro*), en un medio con mayores concentraciones de nitrógeno (aportado en forma de nitrato) y suplementado con ANA y BA (5,0 y 10,0  $\mu\text{M.L}^{-1}$ ) permitió mejorar la tasa de multiplicación de distintos clones de ajo de la variedad Colorado. Este ensayo permitió establecer un protocolo de trabajo eficiente por vía de regeneración directa.

En Venezuela no se han realizado trabajos dirigidos al aumento del índice de multiplicación de brotes de *A. sativum*; sin embargo, Vargas y col. (2006) realizaron un estudio sobre la propagación *in vitro* de otro miembro de la familia Amaryllidaceae, apreciado para fines ornamentales y medicinales (*Hippeastrum* sp.). Los autores obtuvieron que el proceso de multiplicación, al usar bulbos seccionados como explantes iniciales, se vio favorecido al emplear medios de cultivo MS suplementados con BA (0,5  $\text{mg.L}^{-1}$ ) o sin suplemento. En cambio, al partir de bulbos intactos, el mejor tratamiento resultó ser una mayor concentración de la misma fitohormona (BA 2,0  $\text{mg.L}^{-1}$ ); no obstante el promedio de brotes por explante fue mayor con el uso de bulbos seccionados (3,75 vs. 1,9).

### **Bulbificación *in vitro***

Son varios los autores que indican que la presencia de bulbo en la vitroplanta, es un factor decisivo en cuanto a la supervivencia de la misma durante el proceso de aclimatación. Lo anterior es mencionado por González (1984) en su trabajo especial de grado ya descrito.

Luciani (2001), compara medios con distintas concentraciones de nitratos, sales y sacarosa con la finalidad de inducir la formación de microbulbos en vitroplantas de ajo, así como la calidad de la estructura formada. Concluye que la calidad de los microbulbos se encuentra

directamente relacionada con la tasa de supervivencia al momento de transferencia a tierra y su posterior crecimiento.

Resultados similares son acotados por Izquierdo y col. (2002) al evaluar diferentes sustratos en la aclimatación de vitroplantas y microbulbillos de distintos clones de ajo variedad Criollo (*Allium sativum* L.). Al comparar la respuesta al proceso de aclimatación de vitroplantas con y sin microbulbos formados, se obtuvo que la presencia de esta última estructura facilita la adaptación a las condiciones ambientales permitiendo un mayor porcentaje de supervivencia.

Monrroy (2009), evaluó el efecto de distintas concentraciones de sacarosa (3%, 6%, 9% y 12%) en medios constituidos por sales MS, sobre la bulbificación *in vitro* en dos ecotipos de ajo (Colorado de Mendoza y Rosado de Italia) para la obtención de semillas de alta calidad y libre de enfermedades. La investigación permitió concluir que la concentración adecuada de sacarosa, depende del ecotipo siendo 60 g.L<sup>-1</sup> para Colorado y 90 g.L<sup>-1</sup> para el ecotipo Rosado con microbulbos de 5,3 y 7,2 mm de diámetro en promedio.

Yan y col. (2009), empleando el medio Gamborg (B5) determinaron que la formación de bulbos *in vitro* se vio favorecida por altas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo (90 g.L<sup>-1</sup>) en vitroplantas de *Allium chinense*, otro miembro del género *Allium*.

En Venezuela son escasos los trabajos que establecen un protocolo para la formación *in vitro* de bulbos en plantas de ajo, siendo el pionero la investigación llevada a cabo por Mujica y Mogollón (2004) mencionada anteriormente.

Más aún, el protocolo para inducir la formación de bulbos *in vitro* establecido por estos autores, fue implementado por Pardo y col. (2014), en su trabajo sobre Conservación *in vitro* de microbulbos de ajo (*Allium sativum* L.), al igual que en el año 2015 para el análisis genético, mediante marcadores RAPD, de microbulbos de ajo conservados e irradiados *in vitro* (Pardo y col. , 2015). Ambos estudios realizados en el país.

### **3. OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GENERAL**

Establecer un sistema de propagación *in vitro* de *Allium sativum* L.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Obtener vitroplantas de *Allium sativum* a partir de meristemas de bulbos provenientes de dos localidades del estado Mérida.
2. Inducir la formación de bulbos *in vitro* en *A. sativum*.
3. Establecer estrategias que permitan la multiplicación masiva de *A. sativum*.
4. Ensayar el establecimiento en condiciones de vivero de plantas de *A. sativum* obtenidas *in vitro*.
5. Caracterizar morfo-anatómicamente bulbos obtenidos *in vitro* en *A. sativum* con la finalidad de evaluar el proceso de formación de los mismos.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología que se describirá a continuación puede ser separada en las siguientes etapas: establecimiento del cultivo *in vitro*, bulbificación de vitroplantas, multiplicación de vitroplantas y finalmente la aclimatación.

### MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron meristemas aislados de bulbos de *A. sativum* variedad criollo, colectados en las poblaciones de Mucuchíes y El Molino (Fincas El Molino y Lomas del Suspiro), Estado Mérida.

Durante el desarrollo de los resultados y la discusión de los mismos, se hará referencia a los explantes obtenidos del material vegetal proveniente de la localidad de Mucuchíes como **grupo 1**, mientras que se referirá como **grupo 2** al material vegetal proveniente de la localidad de El Molino.

### MÉTODOS

#### *Medios de cultivo*

Los medios de cultivo que se emplearon para todas las etapas de este proyecto estuvieron constituidos por las sales de Murashige y Skoog 1962 (MS) y suplementados con las vitaminas Tiamina y Mioinositol (0,4 y 10 mg.L<sup>-1</sup> respectivamente) y sacarosa a razón de 30 o 90 g.L<sup>-1</sup> según sea el caso. Posteriormente el pH fue ajustado a 5,8 con NaOH o HCL y se incorporó agar al medio como agente gelificante (9,0 g.L<sup>-1</sup>) (Tabla 1). El medio preparado fue

servido en tubos de ensayo o frascos de vidrio estériles (2,5 y 5,0 cm de diámetro respectivamente) y se procedió a su esterilización en autoclave a una temperatura aproximada de 120 °C y 1,5 libras de presión durante 20 minutos.

**Tabla 1.** Composición de los medios de cultivo de las distintas etapas de propagación *in vitro* de ajo.

<b>ETAPA</b>	<b>MEDIO</b>	<b>SUPLEMENTO HORMONAL</b>	<b>SACAROSA*</b>
<b>SALES:</b>	Murashige y Skoog 1962 (MS)	<b>VITAMINAS:</b>	Tiamina (0,4 mg/L) Mioinositol (10 mg/L)
<b>pH:</b>	5,8	<b>AGAR:</b>	9,0 g/L
<b>Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i></b>	<b>M1</b>	ANA (0,2 mg/L) 2iP (0,5 mg/L)	3%
<b>Bulbificación <i>in vitro</i></b>	<b>M2A</b> <b>M2B</b>	2iP (2,0 mg/L) sin hormona	9%
<b>Multiplicación</b>	<b>M3</b> (a partir de brotes) <b>M4</b> (a partir de bulbos)	AIA (2,5 mg/L) K (5,0 mg/L) BA (0,5 mg/L)	3% 3% y 9%
<b>CONTROL</b>	<b>M0</b>	sin hormona	3%

\*3% = 30 g/L; 9% = 90g/L

### *Siembra*

El material vegetal, a usar como explante en cada ensayo, fue sembrado en el medio de cultivo correspondiente bajo condiciones de asepsia en cámara de flujo laminar, colocando un explante por tubo de ensayo y 4 explantes por frasco. Una vez dispuestos los explantes sobre el medio, los tubos y/o frascos fueron cubiertos y sellados con papel Envoplast® con la finalidad de disminuir el riesgo de contaminación.

### *Condiciones de cultivo in vitro*

Posteriormente, el material vegetal sembrado fue incubado en cámara de crecimiento con luz fluorescente continua ( $50 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) y temperatura constante de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  durante el lapso de tiempo indicado para cada ensayo.

### **Establecimiento del cultivo *in vitro***

Durante este experimento, se utilizó la micropropagación de meristemas de bulbillos como método para la obtención de vitroplantas libres de virus según el protocolo de González (1984), las cuales sirvieron como explantes para los ensayos subsiguientes.

Los bulbos o cabezas de ajo fueron disgregados para separar cada bulbillillo o diente (Figura 1) y a estos últimos se les removió las túnicas protectoras. Posteriormente, los dientes sin túnicas fueron sometidos a un protocolo de desinfección, el cual consistió en un primer lavado superficial con jabón líquido antibacterial DioXogen Med<sup>®</sup> y agua corriente, seguido de un lavado con solución yodada al 30% durante 15 minutos, se procedió a enjuagar con agua destilada y un tercer lavado con solución de hipoclorito de sodio (concentración comercial) durante 20 minutos. Finalmente, se realizaron dos enjuagues con agua destilada estéril. Una vez desinfectados los dientes, se aislaron los meristemas a ser usados como explante inicial en esta fase.



**Figura 1.** Material vegetal proveniente de la localidad de Mucuchés, Edo. Mérida. **A)**Bulbos o cabezas de ajo enteras. **B)**Bulbillillos o dientes.

Los meristemas aislados fueron sembrados en medio M1, suplementado con 0,5 mg.L<sup>-1</sup> 2ip y 0,2 mg.L<sup>-1</sup> ANA y una concentración de sacarosa de 30 g.L<sup>-1</sup> según de García y Vargas (2000); y en medio M0 sin suplemento hormonal con la misma concentración de sacarosa. En el medio M1 se cultivaron 55 explantes del grupo 1 y 69 del grupo 2 en medio M1. En el

medio M0, se sembraron 36 explantes únicamente del grupo 1, debido a la limitada cantidad de material vegetal entregada por los productores de ajo.

### **Bulbificación *in vitro***

Al alcanzar una longitud igual o mayor de 10 cm, las vitroplantas provenientes de la etapa anterior (grupo 1 y grupo 2) fueron transferidas a medios de cultivo para inducir la bulbificación según lo establecido por Mujica y Mogollón (2004). Los brotes fueron seccionados a 3 cm a partir de la base y las raíces removidas.

El material vegetal fue sembrado en los medio de cultivo M2A y M2B, el primero suplementado con 2,0 g.L<sup>-1</sup> de 2ip y el segundo sin suplemento hormonal; ambos medios con una concentración de sacarosa de 90 g.L<sup>-1</sup>.

La respuesta en el medio M2A fue evaluada en 32 y 22 explantes pertenecientes al grupo 1 y 2 respectivamente, mientras que la respuesta en el medio M2B fue monitoreada en 13 y 15 explantes del grupo 1 y 2 respectivamente.

### **Etapas de multiplicación**

#### ***Multiplicación a partir de brotes***

Con la finalidad de aumentar el índice de multiplicación (número de brotes formados por explante), se practicó el repique de vitroplantas obtenidos gracias a la micropropagación de meristemas. Para el repique, las vitroplantas de longitud igual o mayor a 10 cm fueron

transferidas, para lo cual se seccionaron a 2 cm a partir de la base y se removieron las raíces. Durante este ensayo se utilizó como material vegetal explantes del grupo 1 (n= 29).

El material vegetal fue sembrado en medio de cultivo M3 (Carhuaricra y col., 2012) sin modificar la concentración de micronutrientes. En este sentido, el medio M3 estuvo suplementado con AIA y KIN a razón de 2,5 y 5,0 mg.L<sup>-1</sup> respectivamente y con una concentración de sacarosa de 30 g.L<sup>-1</sup>.

### ***Multiplicación a partir de bulbos***

En la búsqueda de una técnica que permita la propagación masiva de *A. sativum* se realizó un experimento adicional donde el material vegetal de partida fueron bulbos formados *in vitro* obtenidos gracias a la etapa **b** (Bulbificación *in vitro*):

Con base en los antecedentes de Vargas y col. (2006), se tomaron al azar bulbos formados *in vitro* los cuales fueron segmentados longitudinalmente en mitades iguales bajo condiciones de asepsia. Tales segmentos fueron sembrados sobre medio de cultivo M4 suplementado con BA (0,5 mg.L<sup>-1</sup>) y una concentración de sacarosa de 30 g.L<sup>-1</sup>; se evaluó también la respuesta de los segmentos en medio de cultivo M2B (Tabla 1) y en medio control sin suplemento hormonal y con concentración de sacarosa de 30 g.L<sup>-1</sup>.

La respuesta en el medio M4 fue monitoreada en un total de 8 explantes, mientras que el grupo control consistió en 12 explantes (medio M0 o control). La respuesta en el medio M2B fue registrada en 16 explantes. El material vegetal usado durante este ensayo perteneció al grupo 1.

### ***Observaciones***

En todas las etapas de cultivo se realizaron observaciones periódicas (cada 15 días) cualitativas y cuantitativas con la finalidad de estimar parámetros en función del tiempo transcurrido (días): porcentaje de respuesta, porcentaje de contaminación, longitud del brote (cm), número de raíces por vitroplanta, índice de multiplicación o número de brotes por explante. En cuanto a la formación de bulbos *in vitro*: diámetro alcanzado, índice de multiplicación o número de bulbos por explante, entre otros.

### **Aclimatación**

Con la finalidad de evaluar la supervivencia de los propágulos obtenidos *in vitro*, se transfirieron a tierra un grupo de vitroplantas con y sin presencia de bulbos formados *in vitro*. El sustrato consistió en una mezcla de materia orgánica y arena en proporción 3:1. En primer lugar, se removió cuidadosamente los restos de medio de cultivo de las raíces con agua corriente, luego las vitroplantas fueron sembradas en macetas individuales. Estas macetas fueron colocadas dentro de contenedores plásticos transparentes cubiertos a su vez con papel plástico transparente por una semana. Posteriormente la cobertura fue reducida progresivamente, para lo cual se perforó el papel permitiendo el intercambio gaseoso hasta que finalmente se eliminó la cobertura por completo a los 15 días. Durante este ensayo, las vitroplantas se mantuvieron bajo condiciones de baja intensidad lumínica y temperatura aproximada de  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  y se evaluó el porcentaje de supervivencia en 7 y 16 vitroplantas sin y con presencia de bulbo respectivamente.

### **Estudio morfo-anatómico**

Con la finalidad de evaluar el proceso de formación de los bulbos obtenidos *in vitro*, se realizó la caracterización morfo-anatómica de estas estructuras formadas en medio M2A y/o

M2B. Se trabajó con microbulbos de distintas edades (tiempo transcurrido en medio de bulbificación): 0 días de tratamiento (edad 1), 10 días (edad 2), 20 días (edad 3) y 60 días (edad 4).

Se utilizaron de 2-3 muestras por edad, a las cuales se les realizaron observaciones morfológicas de color, forma, tamaño o diámetro del microbulbo. Los cortes se realizaron a mano alzada en material fresco tomando secciones de aproximadamente 2 cm a partir del punto de donde surgen las raíces, estos se observaron en lupa y/o microscopio óptico sin tinción y con tinción (solución de azul de toluidina).

### **Análisis de resultados**

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el software STATISTICA<sup>®</sup> versión 5,0 para Windows. Las pruebas consistieron en comparaciones de medias mediante la aplicación de ANOVA de una vía; para lo cual fue necesaria la comprobación previa de los supuestos de normalidad y homogeneidad gracias a las pruebas de Shapiro-Wilk W., Kolmogorov-Smirnov y Levene. En caso de obtenerse diferencias significativas, se realizaron pruebas a posteriori de LSD (Least Significant Difference). Por el contrario, en caso de no cumplirse los supuestos, se procedió a aplicar pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis. El nivel de significación fue 0,05 en todas las pruebas aplicadas.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO *IN VITRO*

Al comparar las respuestas de los grupos 1 y 2 en el medio M1, se observó el desarrollo de brotes en ambos grupos luego de 7 días de cultivo. En dicho tiempo, la respuesta hacia la formación de brotes fue de un 79,71 % en el grupo 2, presentando brotes de una longitud promedio de 0,99 cm, mientras que para el grupo 1 se obtuvo una respuesta del 61,82 % con brotes de una longitud promedio de 0,64 cm. Por otro lado el índice de brotes/explante se mantuvo cercano a 1,0 en ambos los casos (**Tabla 2**). De igual forma en el grupo 2, se notó el desarrollo de raíces en un 1,45 % de los explantes mientras que el grupo 1 no ocurrió la formación de raíces.

El aumento en el tiempo de cultivo llevó a un incremento en la respuesta (formación de brotes) de los explantes del grupo 1 y 2. De esta forma, al cabo de 30 días se obtuvo un 89,09 % de explantes con brotes en el grupo 1 y 88,41 % en el grupo 2; más aún, las longitudes promedio registradas fueron brotes de 5,77 cm y 9,57 cm para el grupo 1 y 2 respectivamente. El incremento en el número de vitroplantas con raíces también fue observado al cabo de los 30 días, obteniéndose para el grupo 1 que el 43,64 % de los brotes presentaron raíces con un promedio de 2,05 raíces/vitroplanta; y para el grupo 2, el % de brotes con raíces y promedio de raíces/vitroplanta fueron 71,01 % y 2,04 respectivamente. Por último, el índice de brotes/explante aumentó a 1,32 en el grupo 2 en contraste con el índice del grupo 1, el cual se mantuvo en 1,07 desde los 15 días de cultivo.

El análisis estadístico indicó diferencias significativas entre las longitudes de los brotes para ambos grupos en los distintos tiempos. De igual forma, las diferencias en cuanto a la

presencia de raíces y el promedio de raíces/vitroplanta fue significativo solo a los 15 días de cultivo. La capacidad de respuesta morfogénica de los meristemas aislados de bulbillos, en el medio M1, de ambos grupos son similares. Sin embargo, en el desarrollo que ocurre a posteriori, el análisis estadístico revela diferencias significativas en la longitud promedio de brotes.

**Tabla 2.** Efecto del medio M1 en la respuesta de los meristemas de ajo provenientes de las dos localidades hacia la formación de brotes y raíces. Grupo 1 = Mucuchíes, Grupo 2 = El Molino.

MEDIO DE CULTIVO	GRUPO TIEMPO (días)	1			2		
		7	15	30	7	15	30
M1	FORMACIÓN DE BROTES (%)	61,82	74,55	89,09	79,71	78,26	88,41
	LONGITUD PROMEDIO (cm)	0,64*	3,33*	5,77*	0,99*	2,98*	9,57*
	PROMEDIO DE BROTES/EXPLANTE	1,00	1,07	1,07	1,03	1,07	1,32
	PRESENCIA DE RAÍCES (%)	0,00	5,45*	43,64*	1,45	40,58	71,01*
	PROMEDIO DE RAÍCES/VITROPLANTA	0,00	0,05*	2,05	0,01	0,55*	2,04

\* denota diferencias significativas entre localidades para un mismo parámetro en tiempos semejantes.

Por otro lado, al comparar el uso de los medios de cultivo M1 y M0 (grupo 1), se observó el incremento en la respuesta inicial de los meristemas al mantenerlos en medio M1 en contraste al medio M0 (Tabla 3). Lo anterior se ve reflejado en el porcentaje de brotes formados desde los 7 (61,82 %) hasta los 30 días de cultivo en M1 (88,09 %). Nótese que la respuesta en M0 se mantuvo semejante durante todo el tiempo evaluado (entre 86 y 89%). De igual forma se observó un incremento en la longitud de los brotes en función del tiempo de cultivo, resultando en el desarrollo de brotes de una longitud promedio de 6,16 cm y 8,89 cm a los 30

días de cultivo en medio M1 y M0 respectivamente (Figura 2). Con respecto a la presencia de brotes con raíces, dicho valor pasó de 0 % (7 días de cultivo) a 43,64 % en el medio M1 transcurridos 30 días; por el contrario en el medio M0 en el primer tiempo evaluado la presencia de raíces fue de 17,17 % aumentando a 38,89 % a los 30 días.

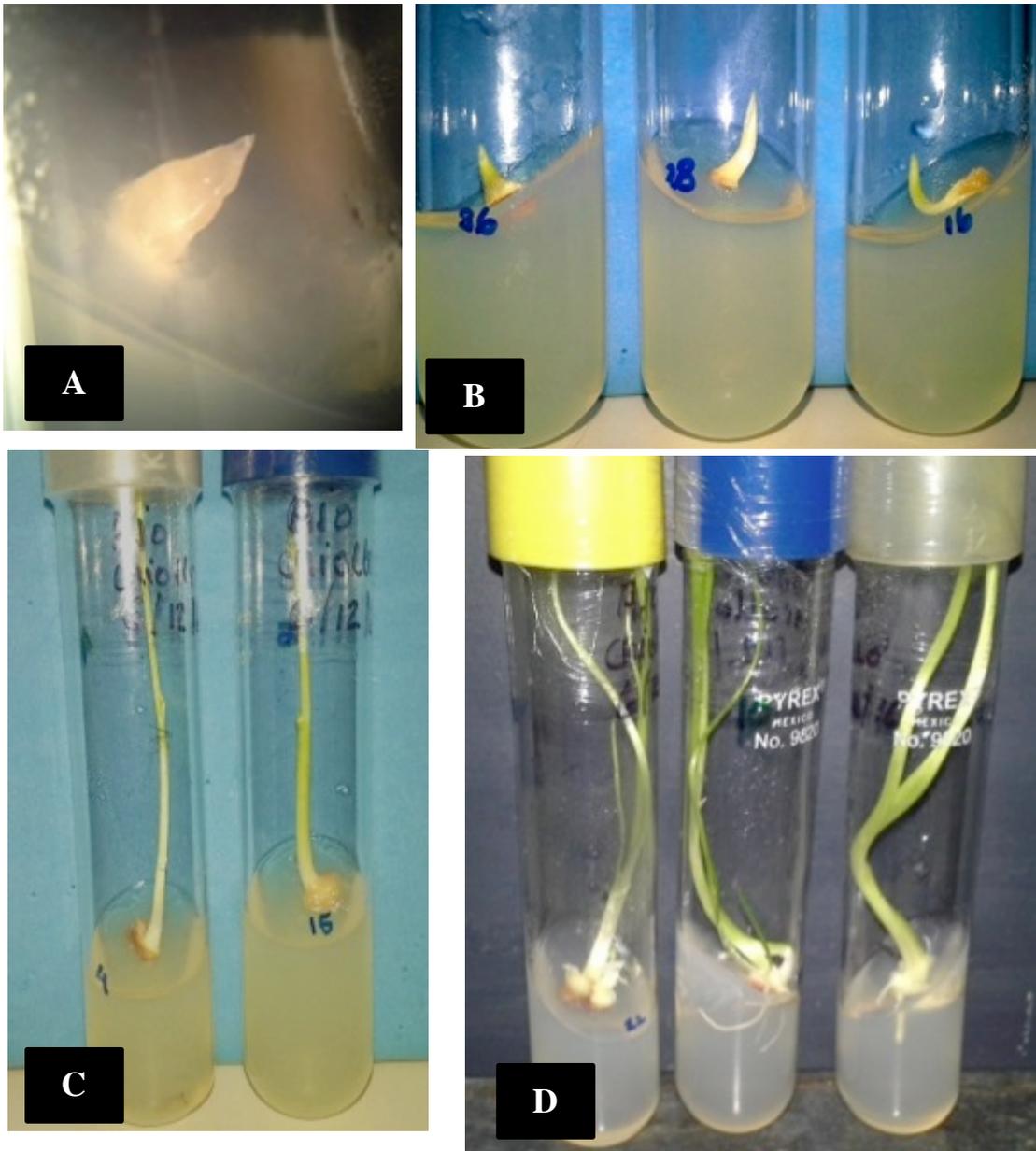
**Tabla 3.** Efecto de medios de cultivo con y sin suplemento hormonal (M1 y M0) sobre la respuesta de meristemas de ajo, hacia la brotación y formación de raíces. Grupo 1 = Mucuchíes.

MEDIO DE CULTIVO	M1			M0		
	7	15	30	7	15	30
<b>GRUPO 1</b>						
<b>FORMACIÓN DE BROTES (%)</b>	61,82	74,55	89,09	86,11	88,89	88,89
<b>LONGITUD PROMEDIO (cm)</b>	0,64*	1,54*	6,16*	1,13*	4,18*	8,89*
<b>PROMEDIO DE BROTES/EXPLANTE</b>	1,00	1,07	1,07	1,19	1,00	1,22
<b>PRESENCIA DE RAÍCES (%)</b>	0,00	5,45*	43,64	14,17	36,11*	38,89
<b>PROMEDIO DE RAÍCES/VITROPLANTA</b>	0,00	0,05*	2,05	0,31	0,94*	1,03

\* denota diferencias significativas entre tratamientos para un mismo parámetro en tiempos semejantes.

El análisis estadístico de los datos reveló que, únicamente la longitud de los brotes presentó diferencias significativas según el tratamiento aplicado (M1 en contraste con M0). Resultados semejantes se obtuvieron con respecto a la presencia de raíces y el número promedio de raíces/vitroplanta a los 7 y 15 días de cultivo, pero no así a los 30 días. Esto indica que transcurridos 30 días, la diferencia entre ambos tratamientos radica en la longitud final de los brotes, siendo mayor en el medio M0.

El desarrollo de brotes a partir de meristemas, yemas o ápices es posible gracias a la acción sinérgica entre las auxinas y citocininas agregadas en el medio de cultivo en conjunto con el



**Figura 2.** Micropropagación a partir de meristemas de ajo correspondientes al grupo 1 en medio M1. A) Meristema aislado y sembrado en medio de cultivo. Brotes transcurridos B) 7 días, C) 15 días y D) 30 días.

balance hormonal endógeno presente en el explante inicial. De esta forma, ya que las citocininas son sintetizadas principalmente en las raíces, la adición exógena de estas fitohormonas es usualmente requerida debido al bajo contenido endógeno de la misma en los meristemas. Por el contrario, las zonas de crecimiento activo (meristemas, yemas, ápices) son sitios donde ocurre la síntesis de auxina, por lo que la concentración endógena en estos explantes es alta, requiriéndose una baja o ninguna adición exógena de auxinas en el medio de cultivo, aunque depende del tamaño del explante y la especie vegetal. No obstante, cuando el balance endógeno entre auxinas y citocininas es apropiado, puede ocurrir igualmente el desarrollo de brotes sin la adición de auxinas o citocininas al medio de cultivo (Jiménez, 1998b).

El tiempo de respuesta hacia el desarrollo de brotes obtenido en esta investigación, es similar al indicado por Gad El-Hak y col. (2011) usando medios MS sin suplemento hormonal y con AIA y BA (0,1 y 1,0 mg.L<sup>-1</sup>) para el cultivo de meristemas de ajo de dos clones diferentes. Los brotes iniciaron su formación luego de 3 y 9 días de cultivo (según el clon) en cualquiera de los medios; sin embargo, al aumentar al doble la concentración de auxina y citocinina la formación de brotes se retrasó significativamente en ambos clones.

Al cultivar ápices meristemáticos de una variedad de ajo distinta (cv. Bangladesh), en medio MS sin suplemento hormonal Shahiduly col. (2003) indicaron que el desarrollo de brotes inició luego de 2 semanas con una respuesta de 95,56 %, obteniéndose brotes de aproximadamente 2 cm a las 3 semanas de cultivo; mientras que el uso de ANA y BA en el medio retrasó aún más la formación de brotes y la respuesta fue menor (87,22 %).

En cuanto a los resultados del presente estudio, la respuesta de los explantes en los medios M1 y M0, difieren de los obtenidos por Carhuaricra y col. (2012), quienes al trabajar con meristemas de ajo var. Morado Barranquino registraron una mayor respuesta (% de desarrollo de brotes y longitud de brotes) en medios con BA y ANA en comparación a medios sin suplemento hormonal. Resultados similares reportan Izquierdo-Oviedo y col. (2016), al obtener un mayor porcentaje de formación de brotes (90 %) al trabajar con medios MS suplementados con concentraciones iguales de ANA y KIN ( $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ ), mientras que la respuesta en medios MS sin suplemento hormonal fue 60% incluso luego de 30 días de cultivo.

Por otra parte, los resultados correspondientes al medio M1 son similares a los de Pardo y col. (2011), quienes reportan longitudes de 4 a 4,6 cm en meristemas cultivados por 30 días en medio MS suplementado con ANA y 2ip ( $0,1$  y  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Sin embargo, en un medio con las mismas sales (MS) y suplementado con una mayor concentración de ANA y 2ip ( $0,5$  y  $0,64 \text{ mg.L}^{-1}$ ), López y col. (2014) registraron una longitud promedio menor luego de 5 semanas de cultivo.

Resultados similares a los obtenidos en la presente investigación fueron presentados por Ayed y col. (2018), quienes al cultivar ápices caulinares en medio MS sin suplemento hormonal y con ANA y KIN ( $0,25$  y  $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) observaron porcentajes de respuesta similares hacia el desarrollo de brotes, los cuales presentaron alturas promedios de 2,1 cm y 5,6 cm en cada medio empleado (sin y con suplemento hormonal) luego de 4 semanas de cultivo.

Otros autores han implementado con éxito el uso de auxinas y citocininas en el medio de cultivo con la finalidad de establecer un cultivo *in vitro* de ajo (Zheng y col., 2003; Keller y Senula, 2013), aunque lo mismo es posible agregando auxinas como único suplemento hormonal (Maldonado, 2003). Sin embargo, la adición de fitohormonas no es un factor limitante para el desarrollo de brotes a partir de meristemas, lo que queda demostrado por Monrroy (2009) y Taskiny col. (2013) quienes obtuvieron respuestas superiores a 90 %.

## ETAPA DE BULBIFICACIÓN

### *Medio con fitohormonas y alta concentración de sacarosa*

Los brotes o explantes del grupo 1 sembrados en el medio M2A, presentaron las siguientes características a los 30 días de cultivo: una longitud promedio de 6.73 cm con un promedio de 1,30 brotes/explante, de igual forma el 50% de los brotes presentaron raíces con un promedio de 4,65 raíces/vitroplanta (Tabla 4). Más aún, a los 30 días de cultivo se registraron los primeros cambios morfológicos asociados a la formación de bulbos al observar un engrosamiento en la base del brote, lo que ocurrió en el 30% de los explantes (Figura 3A).

La cantidad de bulbos formados aumentó con el transcurso del tiempo de cultivo, de esta forma al cabo de 60 días se logró el 100 % en la formación de bulbos en las vitroplantas de ambos grupos (Figura 3B). Adicionalmente, se observó la formación de más de un bulbo por explante o la bulbificación múltiple en el 61,54 % y 41,67 % de los explantes del grupo 1 y 2 respectivamente (Figura 3C y D); obteniéndose entre 2 y 5 bulbos por explante en el grupo 1 y de 2 a 4 bulbos por explante en el grupo 2. El promedio global de bulbos/explante estimado para el grupo 1 fue 1,67, mientras para el grupo 2 fue 2,38 bulbos/explante. Además, se encontró que el 54,55 % de los bulbos formados *in vitro* del grupo 1 presentaron raíces, por otro lado en el grupo 2 la presencia de raíces ocurrió en el 25 % de las vitroplantas. Cabe destacar que la formación de raíces ocurrió tanto en bulbos simples como en bulbos múltiples.

A los 90 días de cultivo, la bulbificación múltiple en el grupo 1 se mantuvo, mientras que en el grupo 2 fue igual a 46,67 % formándose 3,14 bulbos múltiples en promedio por cada explante. Adicionalmente, en el grupo 2 se observó un aumento en la presencia de raíces (40 %) a diferencia del grupo 1, el cual se mantuvo en 61,54 %.

**Tabla 4.** Efecto del 2ip (2,0 mg.L<sup>-1</sup>) y una alta concentración de sacarosa en el medio de cultivo, sobre la bulbificación en vitroplantas de ajo obtenidas por micropropagación. Grupo 1 = Mucuchíes, Grupo 2 = El Molino.

MEDIO	GRUPO	1		2	
		60	90	60	90
	TIEMPO (días)				
	<b>BULBIFICACIÓN (%)</b>	100,00	100,00	100,00	100,00
	<b>BULBIFICACIÓN MÚLTIPLE (%)</b>	61,54	61,54	41,67	46,67
<b>M2A</b>	<b>PROMEDIO DE BULBOS MÚLTIPLES/EXPLANTE</b>	3,25*	3,25*	2,60*	3,14*
	<b>PROMEDIO GLOBAL DE BULBOS/EXPLANTE</b>	2,38	2,38	1,67	2,00
	<b>PRESENCIA DE RAÍCES (%)</b>	61,54	61,54	25,00	40,00

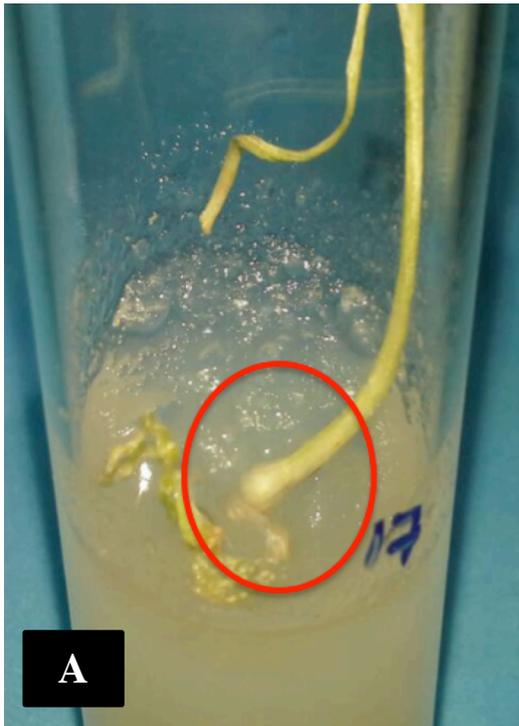
\* denota diferencias significativas entre localidades para un mismo parámetro a un tiempo dado.

El análisis estadístico de los datos arrojó que, ambos grupos mostraron diferencias significativas solo en el número promedio de bulbos múltiples por planta. Pese a lo anterior, el promedio global de bulbos/explante no muestra diferencias significativas. No obstante, los resultados sugieren que, el uso de medios con una alta concentración de sacarosa y 2ip como suplemento hormonal, favorece la formación de un mayor número de bulbos.

En este sentido, la bulbificación múltiple coincide con los resultados obtenidos por Mujica y Mogollón (2004), quienes probaron el efecto de distintas citocininas sobre la formación de bulbos *in vitro* en brotes de ajo morado. Aunque la bulbificación fue exitosa al utilizar BA, Z y 2ip (100%), únicamente el uso de 2ip produjo la formación de más de un bulbo por explante. Sin embargo, el porcentaje de explantes mostrando bulbificación múltiple reportado por los autores fue solo de 2% luego de 8 semanas de cultivo.

Izquierdo y col. (2016), al emplear medios sólidos con 7,5 % de sacarosa y concentraciones mayores de 2ip (4 mg.L<sup>-1</sup>) que la empleada en este estudio, obtuvieron un 86,10 % de bulbificación en vitroplantas de ajo luego de 51 días de cultivo, aunque obtuvieron resultados similares sin el uso de fitohormonas. Khalid y col. (2001), encontraron resultados similares con respecto a la formación de bulbos en vitroplantas de cebolla (*Allium cepa*); al emplear medios con citocinina (4PU<sub>30</sub>) o con 10 % de sacarosa la bulbificación fue cercana al 80%. Adicionalmente, otras hormonas como el JA, han sido utilizadas con éxito para la formación de bulbos *in vitro* en ajo (Rossi y col., 1997).

La adición de citocininas a los medios de cultivo como promotores de la formación de bulbos *in vitro*, ha sido reportada en otras especies vegetales capaces de formar órganos de reserva (Uranbey, 2010; Taha y col., 2018), lo que sugiere una relación entre la acción de las citocininas y la inducción y formación de órganos de reserva. Más aún, análisis de CG-MS demuestran que durante la formación de órganos de reserva *in vitro*, la concentración de la hormona agregada para lograr la formación de estos órganos, es mayor en el bulbo que en las hojas (Rossi y col., 1997).



**Figura 3.** Bulbificación en vitroplantas de ajo del grupo 1 en medio M2A. **A)** Inicio de la formación de los bulbos a los 30 días de cultivo. **B)** Bulbos formados luego de 60 días. **C y D)** Explantes mostrando bulbificación múltiple.

### **Medio sin fitohormonas y alta concentración de sacarosa**

En el medio M2B hubo formación de bulbos simples en el 100 % de las vitroplantas de *A. sativum* de ambos grupos a los 90 días de cultivo (Tabla 5). El número de bulbos/explante fue 1,0 para ambos casos. En algunos casos, se observó que los bulbos desarrollados en este medio presentaron una coloración verde en contraste con los formados en el medio M2A, cuyas hojas externas eran blancas (Figura 4). No obstante, igualmente se notó la presencia de raíces.

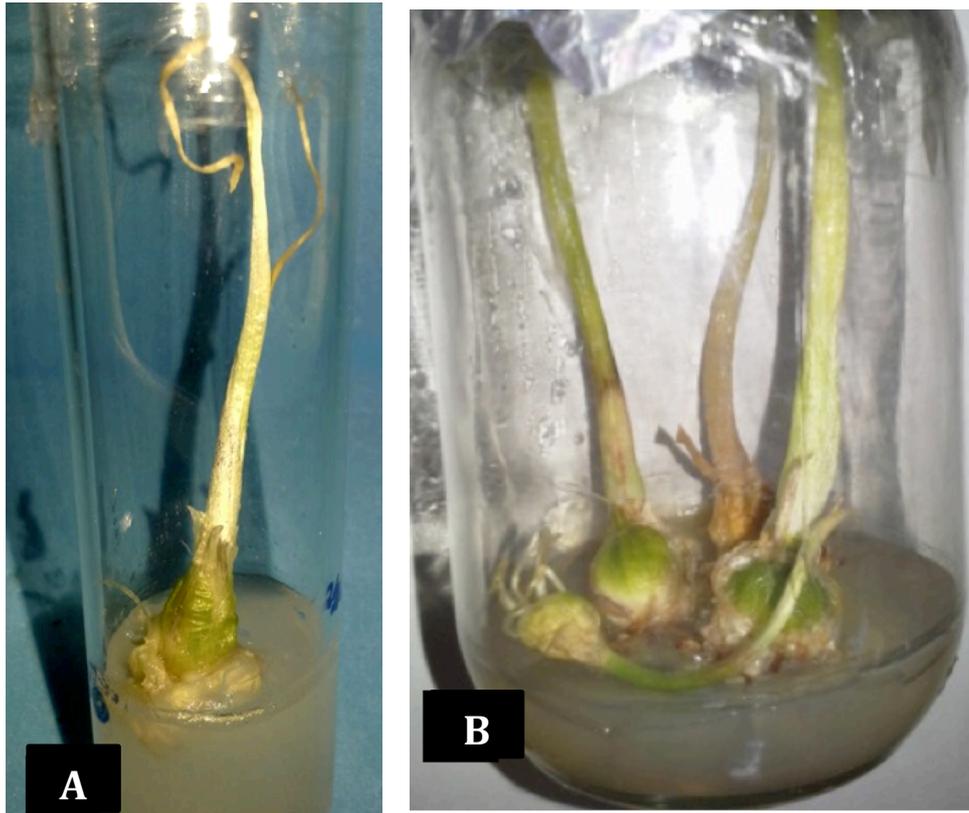
**Tabla 5.** Efecto de una alta concentración de sacarosa en el medio de cultivo, sobre la bulbificación en vitroplantas de ajo obtenidas por micropropagación. Grupo 1 = Mucuchíes, Grupo 2 = El Molino.

<b>MEDIO</b>	<b>TIEMPO</b>	<b>90 días</b>	
		<b>GRUPO 1</b>	<b>GRUPO 2</b>
<b>M2B</b>	<b>BULBIFICACIÓN (%)</b>	100	100
	<b>BULBIFICACIÓN MÚLTIPLE (%)</b>	0	0
	<b>PROMEDIO DE BULBOS/EXPLANTE</b>	1,00	1,00

Los resultados parecen señalar, que la adición de 9 % de sacarosa en el medio, induce la bulbificación simple en las vitroplantas de ajo. Mientras que, la combinación de alta sacarosa y 2ip, induce la formación de bulbos múltiples.

Según lo anterior, el aumento en la concentración de sacarosa en el medio es un tratamiento efectivo que induce de igual forma la bulbificación *in vitro*, y que en conjunto con la acción hormonal puede aumentar el diámetro y masa fresca de los bulbos (Khalid y col., 2001; Mujica y Mogollón, 2004).

Los resultados obtenidos, coinciden con lo reportado por Mujica y Mogollón (2004) al evaluar el efecto individual de la concentración de sacarosa sobre la formación de bulbos *in vitro* de ajo Morado. Luego de 8 semanas, los autores notaron que la masa y el diámetro incrementaron en función de la concentración de sacarosa empleada, obteniendo el máximo resultado con 9% de sacarosa.



**Figura 4.** Bulbificación en vitroplantas de ajo del grupo 1 en medio M2B. **A)** Formación de bulbo a los 60 y **B)** 90 días de cultivo.

Robledo-Paz y col. (2000), notaron la formación de bulbos *in vitro* en brotes de dos cultivares de ajo luego de 10 semanas al usar medios de cultivos con las sales de MS,  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BA y una concentración de sacarosa de  $19,85 \text{ g.L}^{-1}$ .

De igual forma, Yan y col. (2009) favorecieron la formación de bulbos *in vitro* en *Allium chinense* al usar 9 % de sacarosa en un medio de cultivo con sales B5. La misma concentración de sacarosa fue empleada por Nagakubo y col. (1997) para inducir la

formación de bulbos *in vitro* en *Allium sativum* L. cv. Hawaito-roppen, luego de 10 semanas de cultivo en medio con sales MS. Por otro lado, Monrroy (2009) consiguió la formación de bulbos *in vitro* en ajo colorado y ajo rosado usando medios de cultivo con sales MS y concentraciones de sacarosa de 6 % y 9 % respectivamente.

La formación de bulbos *in vitro* por efecto del aumento en la concentración de sacarosa ocurre exitosamente incluso al usar medios de cultivos líquidos compuesto por sales MS y 11% de sacarosa luego de aproximadamente 9 semanas de cultivo (Kim y col, 2003).

El efecto inductor de la sacarosa sobre la formación bulbos, se debe a que durante la formación de órganos de reserva, la sacarosa como fuente de carbohidratos es transportada desde el medio de cultivo hacia el tejido sumidero, en este caso el órgano de reserva (Stevenson y Harrington, 2009 mencionado por Ashraf y col., 2013). Por otro lado, también genera un efecto de estrés osmótico ya que reduce el potencial hídrico del medio restringiendo la disponibilidad de agua para el explante lo que puede conducir a la formación del órgano de reserva (Pruski y col., 2000 mencionado por El-Dawayati y col., 2012). Así, tanto la alta disponibilidad de sustrato como el aumento en la osmolaridad del medio de cultivo, promueven en conjunto la bulbificación *in vitro* (Staikidou y col., 2005).

## ETAPA DE MULTIPLICACIÓN

### *Multiplicación a partir de brotes*

A los 15 días de cultivo en medio M3, el 72,41% de los brotes mostraron crecimiento, obteniéndose longitudes promedio de 3,73 cm y un índice de multiplicación de 1,24 brotes/explante (Tabla 6). Adicionalmente se estimó que la formación de raíces ocurrió en el 17,24 % de los brotes, obteniéndose un promedio de 1,2 raíces/vitroplanta con una longitud promedio de 0,62 cm cada una.

Luego de 20 días de cultivo se notó el aumento de la longitud promedio de los brotes (6,91 cm), no obstante el porcentaje de respuesta o crecimiento del brote inicial se mantuvo igual al anterior (72,41 %). Sin embargo, tanto el % de brotes con raíces como el promedio de raíces/vitroplanta, incrementaron a 48,83 % y 2,54 respectivamente, de igual forma la longitud promedio de cada raíz pasó a 1,55 cm. Mientras tanto, el índice de multiplicación se mantuvo semejante al reportado anteriormente (1,28 brotes/explante).

Una vez completados 70 días de cultivo, si bien se registró un leve aumento en la respuesta de los brotes iniciales (75,86 %), la formación de brotes *de novo* ocurrió en tan solo el 34,48 % de los explantes sometidos al tratamiento, por lo que se obtuvo un índice de multiplicación de 1,48 brotes/explante (Figura 5A, B y C). No obstante, el análisis estadístico de los índices de multiplicación arrojó que las diferencias no son significativas, incluso tras 70 días de cultivo. Adicionalmente, dichos brotes eran muy delgados y no superaban los 8 cm de longitud, por lo que fueron transferidos a medio M1 con la finalidad de incrementar su grosor.

Para esto, todos los brotes adventicios formados fueron separados y cultivados en medio M1 por 30 días (Figura 5D). El resultado fue una respuesta o crecimiento en el 72,22 % del nuevo grupo muestral y un índice de multiplicación estimado de 1,83 brotes/explante contrario a lo esperado. A pesar de este aumento, el análisis estadístico demostró que las diferencias entre las medias no son significativas.

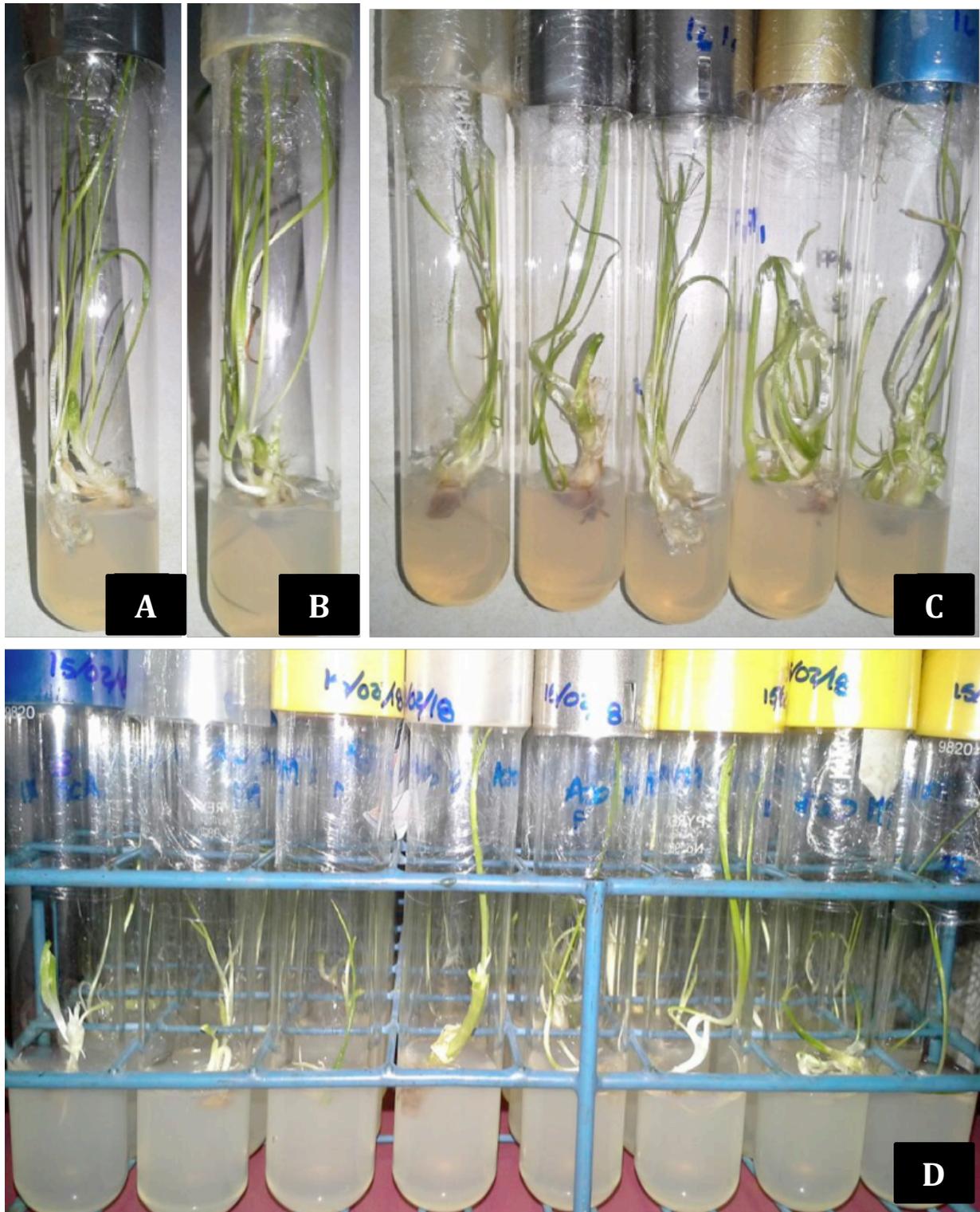
**Tabla 6.** Efecto del suplemento hormonal del medio de cultivo, sobre la formación de brotes *de novo* en vitroplantas de ajo obtenidas por micropropagación a partir de brotes. Grupo 1 = Mucuchíes.

GRUPO	MEDIO	M3			M1
	TIEMPO (días)	15	20	70	30
1	<b>CRECIMIENTO DE LOS BROTES INICIALES (%)</b>	72,41	72,41	75,86	72,22
	<b>PROMEDIO DE BROTES/EXPLANTE</b>	1,24	1,28	1,48	1,83
	<b>LONGITUD PROMEDIO (cm)</b>	3,73	6,91	8,00	10,00

Los brotes que presentaron un grosor adecuado al utilizar M3 fueron directamente sembrados en medio de bulbificación. Mientras que aquellos brotes que requerían aumentar su grosor fueron transferidos a medio control o M0 luego de ser mantenidos en M1. Finalmente, una vez logrado el endurecimiento de tales vitroplantas, los brotes fueron sembrados en medio de bulbificación.

Es preciso acotar que el uso de AIA y KIN (2,5 y 5 mg.L<sup>-1</sup>) como suplemento hormonal en el medio de cultivo, fue utilizado con éxito por Carhuaricray col. (2012), quienes lograron un índice de multiplicación igual a 4,71 en ajo Morado Barranquino, contrario a lo obtenido en el presente trabajo. No obstante, la modificación en los macronutrientes del medio MS usada

por los autores sugiere que las altas concentraciones disponibles en el medio, en sinergia con la acción de las fitohormonas mencionadas, tienen en este caso una influencia sobre el



**Figura 5.** Multiplicación de brotes de ajo del grupo 1. A) Formación de brotes *de novo* luego de 70 días de cultivo en medio M3 y B) 30 días en medio M1.

desarrollo de brotes *de novo*. En relación a esto, Luciani (2001) concluye que durante la etapa de multiplicación, una alta concentración de nitrógeno en el medio (aportado en forma de nitrato) en combinación con el uso de una alta concentración de citocinina frente a una baja de auxina, favorece la formación de brotes adventicios.

Al trabajar con vitroplantas de ajo, Monrroy (2009) obtuvo un índice de multiplicación promedio de 2,2 brotes/explante al usar medios MS modificados en sus macronutrientes y suplementados con una mayor concentración de auxina que de citocinina. Lo anterior sugiere que la concentración endógena de citocininas fue la adecuada para promover la formación de brotes *de novo*. Igualmente ocurre durante la multiplicación de vitroplantas de *Lilium* sp. (Liliaceae), donde la adición exógena de altas concentraciones de auxina con respecto a citocinina permitió un índice de multiplicación de 9,33 brotes/explante (Taha y col., 2018).

Sin embargo, la modificación de los macroelementos presentes en el medio de cultivo, no es un factor determinante para el incremento del índice de multiplicación durante la propagación *in vitro* de ajo. En este caso, y al igual que en la bulbificación, el balance auxina/citocinina juega un rol fundamental en la inducción de la formación de brotes *de novo*; por lo general una mayor concentración de citocinina es requerida tal que se rompa la dominancia apical y se estimule la brotación de yemas axilares. La adición de auxinas es opcional, pudiendo estimular el normal crecimiento de los nuevos brotes (Orellana, 1998).

En este sentido, Seabrook (1993) reportó entre 6,1 y 9,5 brotes/explante al experimentar con cinco tipos de ajo, empleando medios de cultivo MS suplementado con 2,0 mg.L<sup>-1</sup> de BA y 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de ANA. Aunque, el uso de iguales concentraciones de BA y ANA (2,0 mg.L<sup>-1</sup>) en

medios de cultivo MS, permitió un índice de multiplicación de 6,30 brotes/explantes en ajo cultivar Balady (Bekheet, 2006).

En similitud a los resultados expuestos en este trabajo, Ayed y col. (2018), reportaron un índice de multiplicación de 1,7 brotes/explante en vitroplantas de ajo; los autores emplearon medio MS suplementado con BA y ANA (1,0 y 0,25 mg.L<sup>-1</sup>). En contraste, Izquierdo y col. (2016), señalaron que en vitroplantas de ajo, la adición de 2ip y ANA en el medio de cultivo (MS) permite la obtención de un mayor número de brotes/explante (7,01) si se compara con la acción de ANA y BA (5,66 brotes/explante) o ANA y KIN (6,04 brotes/explante). Adicionalmente, el uso de 2ip como suplemento hormonal único en medios de cultivo MS líquidos, ha desmostado ser un tratamiento efectivo para la multiplicación *in vitro* de brotes de ajo cultivar Danyang (Kim y col., 2003).

### ***Multiplicación a partir de segmentos de bulbos***

Los explantes (segmentos de bulbos obtenidos *in vitro*) mantenidos tanto en el medio de cultivo M4 como en el M0 o medio control, presentaron como respuesta la formación de brotes (Figura 6); se notó adicionalmente que al segmentar los bulbos, los meristemas quedaron expuestos. Dichos brotes, mostraron las mismas características morfológicas (color, forma de las hojas, etc.) que aquellos desarrollados durante la etapa de establecimiento del cultivo. En algunos casos se observó como respuesta inicial la formación de raíces y posteriormente la formación del brote.

El número de brotes aumentó en función del tiempo transcurrido en el medio de cultivo empleado, siendo más rápida en los explantes mantenidos en medio M4 (Figura 6A y B). En este sentido, luego de tan solo 2 días en este medio, se obtuvo la formación de brotes en el 28,57 % de los explantes con un promedio de 1,50 brotes/explantes, de los cuales el 50 % presentaron raíces y una longitud promedio de 2,10 cm. En contraste y para el mismo tiempo de cultivo, los explantes en medio M0 no mostraron formación de brotes (Tabla 7).

A los 20 días de cultivo la presencia de brotes aumentó en ambos medios, siendo igual al 57,14 % y 11,11 % en el medio M4 y M0 respectivamente. Sin embargo, el promedio de brotes/explantes fue semejante al inicial en el caso del medio M4, mientras que en el medio M0 fue igual a 1,0; estos valores se mantuvieron constantes incluso a los 30 días de cultivo. La longitud promedio de los brotes aumentó en ambos tratamientos, alcanzado 2,60 cm en el medio M4 y 1,65 cm. en el medio M0. De igual forma, el 100% de los brotes formados desarrollaron raíces en ambos casos.

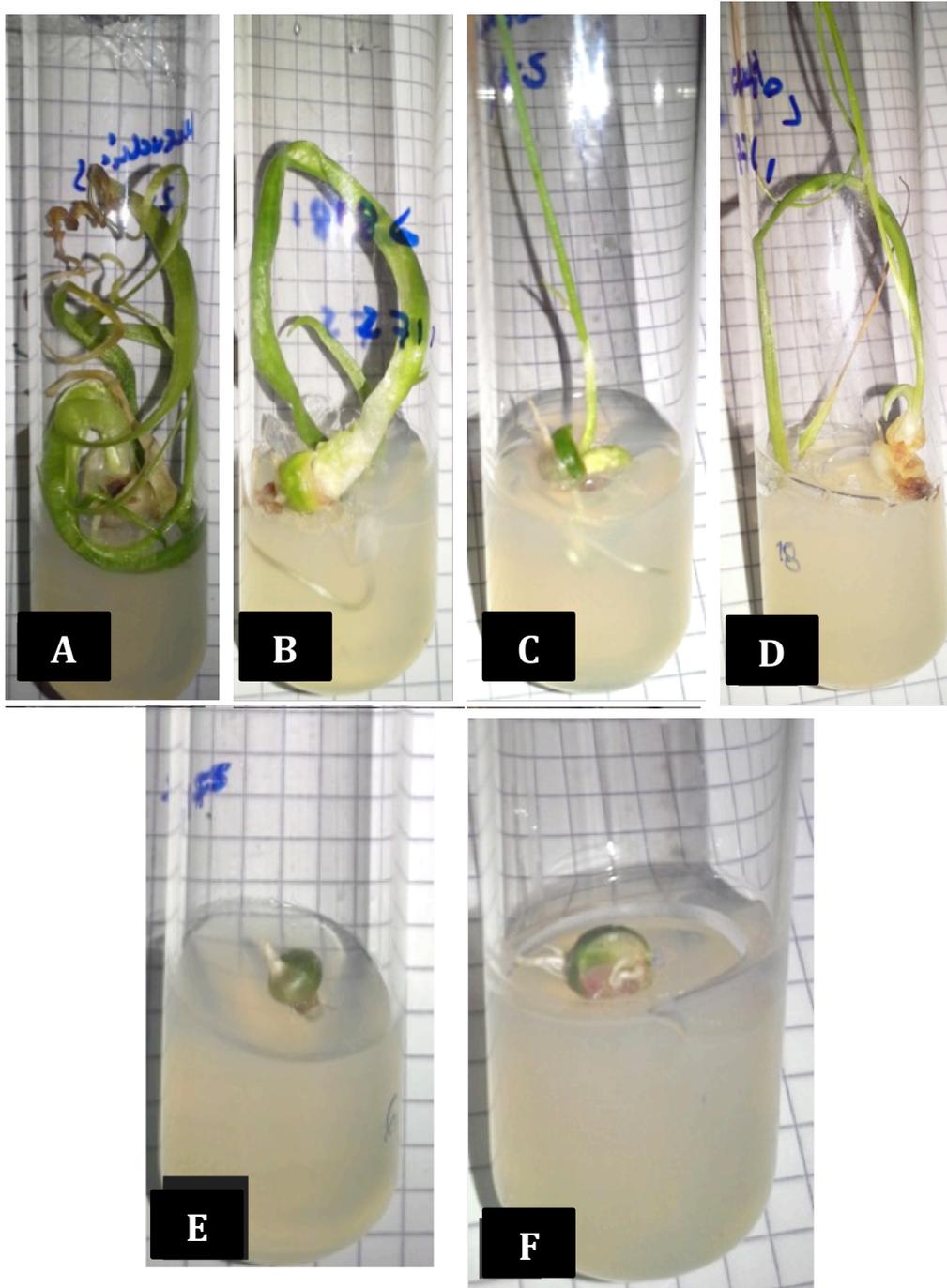
Finalmente, a los 30 días de cultivo fue relevante el aumento de la longitud promedio de los brotes tanto en medio M4 como M0 (8,75 cm y 4,35 cm respectivamente). Sin embargo, el análisis estadístico de los parámetros estudiados, reveló que las diferencias entre los tratamientos no son significativas aún al cabo de 30 días de cultivo.

**Tabla 7.** Efecto del suplemento hormonal en el medio de cultivo sobre la formación de brotes *de novo* a partir de segmentos de bulbos de ajo obtenidos *in vitro*. Grupo 1 = Mucuchíes.

GRUPO	TIEMPO (DÍAS) MEDIO	2	20	30	2	20	30
		M0			M4		
1	PRESENCIA DE BROTES (%)	0,00	18,18	36,36	28,57	57,14	57,14
	PROMEDIO DE BROTES/EXPLANTE	0,00	1,00	1,00	1,50	1,25	1,25
	LONGITUD PROMEDIO DE LOS BROTES (cm)	0,00	1,65	4,35	2,10	2,60	8,75
	PRESENCIA DE RAÍCES (%)	0,00	100,00	100,00	50,00	100,00	100,00

Al adicionar  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de BA en el medio de cultivo, se esperaba un índice de multiplicación mayor en concordancia con lo reportado por Vargas y col. (2006), quienes al cultivar segmentos de bulbos de *Hippeastrum* sp. (Amaryllidaceae) en medios MS suplementados con distintas concentraciones de BA, obtuvieron un máximo de 3,75 brotes/explante en contraste con el número de brotes *de novo* formados al usar bulbos intactos como explante inicial (máximo de 1,9 brotes/explante) al cabo de 45 días de cultivo.

Asimismo, el uso de segmentos longitudinales de brotes de ajo (obtenidos *in vitro*) como explante inicial, parece favorecer la formación de brotes adventicios en medios con suplemento hormonal (Luciani, 2001). Lo que coincide con Gad El-Hak y col. (2011), quienes reportan un promedio de entre 2 y 3 brotes/explantes en dos cultivares de ajo al usar



**Figura 6.** Multiplicación a partir de segmentos de bulbos formados *in vitro*. **A y B)** Brotes formados en medio M4 y **C y D)** en medio M0 o control a los 30 días de cultivo. **E y F)** Segmentos de bulbos en medio M4 que no formaron brotes.

medio MS con adición de auxina (AIA) y citocininas (KIN o BA), aunque la misma respuesta fue registrada sin la adición de fitohormonas, lo que sugiere que el balance endógeno auxinas/citocininas fue el adecuado para promover la brotación de yemas axilares.

Ncube y col. (2014) discuten que, el aumento en el índice de multiplicación en segmentos de bulbo de tres especies de *Cyrtanthus* (Amaryllidaceae), se debe a la formación de brotes adventicios directamente a partir de los segmentos de bulbos; esto ocurre en las axilas de las capas del órgano de reserva y es el producto de la elongación de meristemas axilares preexistentes; por lo que el número de brotes formados depende de la cantidad de meristemas. Más aún, los autores encontraron que la adición exógena de altas concentraciones de citocinina (entre 1,0 y 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de BA) y menores de auxina (0,2 y 0,5mg.L<sup>-1</sup> de ANA) son necesarias para la producción de múltiples brotes/explante. Como ya se ha mencionado, la acción sinérgica entre auxina y citocininas resulta a menudo en la formación de órganos *de novo*.

Por otro lado, la respuesta obtenida en aquellos explantes sembrados en medio M2B fue distinta a la esperada, observándose la regeneración o formación de bulbos *in vitro* completos a partir de los bulbos segmentados. Más aún, los bulbos formados presentaban las mismas características morfológicas de los obtenidos en la etapa de bulbificación *in vitro*. La frecuencia de esta respuesta aumentó en función del tiempo de cultivo. De esta forma, al cabo de 10 días se obtuvo formación de bulbos completos en un 26,67 % del total de los explantes, pasando a 36,36 % a los 20 días y 62,50 % a los 30 días de cultivo.

Sin embargo, la formación de bulbos completos no siempre involucró el desarrollo de brotes; aunque, con el transcurso de los días la presencia de los mismos aumentó, obteniéndose un promedio de brotes/explantes de 1,00 en el 62,50 % de los explantes a los 30 días de cultivo.

**Tabla 8.** Efecto de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo sobre la brotación y regeneración de segmentos de bulbos obtenidos *in vitro*. Grupo 1 = Mucuchés.

GRUPO	TIEMPO (DÍAS)	10	20	30
	MEDIO		M2B	
	<b>FORMACIÓN DE BULBO NUEVO (%)</b>	26,67	36,36	62,50
<b>1</b>	<b>PRESENCIA DE BROTES (%)</b>	26,67	18,18	62,50
	<b>PRESENCIA DE RAÍCES (%)</b>	20,00	18,18	25,00

Los resultados expuestos sugieren que un aumento en la concentración de sacarosa en el medio de cultivo, promueve la formación de bulbos *in vitro* cuando se usan como explantes brotes o secciones de bulbos de ajo. Sin embargo, resultados similares no han sido reportados por otros autores en sistemas de propagación *in vitro* de ajo o incluso otros miembros del género *Allium*.

Un protocolo similar fue evaluado por Santos y col. (2006) durante la formación de brotes adventicios a partir de segmentos de bulbos en *Hyacinthus orientalis* (Liliaceae), los cuales luego de 8-10 semanas de cultivo desarrollaron bulbos *in vitro*. No obstante y a diferencia del medio M2B, el utilizado por los autores consistió en sales MS modificadas y con una concentración de sacarosa del 3 % más un suplemento hormonal (IBA y BA). Aunque el desarrollo inicial de brotes y bulbos, ocurrió en un medio con suplemento hormonal, es probable que la modificación de los macro y micronutrientes haya tenido un efecto positivo sobre la formación de estas estructuras.

Por otro lado, al trabajar con mitades de bulbos de *Crinum macowanii* (Amaryllidaceae) previamente obtenidos *in vitro*, Slabbert y col. (1993) lograron la multiplicación de brotes los cuales luego de 12-16 semanas desarrollaron bulbos. Los explantes iniciales presentaban un diámetro igual o mayor a 5 mm y fueron cultivados en medio MS sin suplemento hormonal y con una concentración de sacarosa estándar (3 %).

## ACLIMATACIÓN

Como se ha mostrado en los resultados antes expuestos, la presencia de raíces fue observada en todos los medios de cultivos utilizados sin importar el contenido de sacarosa (3 % o 9 %) o el suplemento hormonal (o la ausencia del mismo), por tal motivo no fue necesaria una fase de enraizamiento previa a la aclimatación.

La presencia de raíces es un requisito importante en aquellas vitroplantas que serán aclimatadas, ya que aumenta la probabilidad de supervivencia en condiciones *ex vitro*. El uso de medios suplementados únicamente con auxinas ha sido igualmente usado con éxito para inducir la formación de raíces. Tal es el caso de Bekheet (2006) y Gull y col. (2014) quienes indujeron la formación de raíces al usar AIA y ANA respectivamente. Además, Vieira y col. (2014) notaron la presencia de raíces en medios con IBA al usar entre 0,1 y 0,2 mg.L<sup>-1</sup>. No obstante el uso de citocininas como único suplemento hormonal también permite la formación de raíces, incluso en un menor tiempo (Gull y col., 2014).

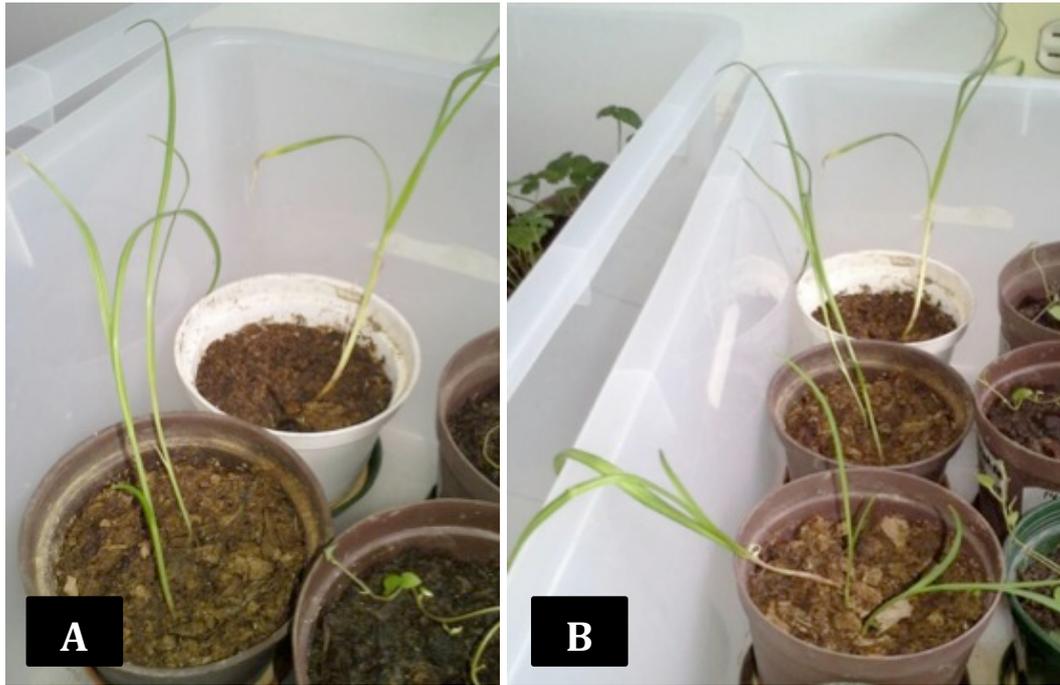
Adicionalmente, el uso de combinaciones de auxinas y citocininas en el medio de cultivo conlleva igualmente al desarrollo de raíces luego de 8-10 días de cultivo según (Gad El-Haky col., 2011); obteniendo resultados favorables al trabajar con AIA (0,1-0,2 mg.L<sup>-1</sup>) y KIN o BA (1,0-2,0 mg.L<sup>-1</sup>). Resultados similares fueron reportados por Izquierdo y col. (2016) al encontrar enraizamiento gracias al uso de distintas citocininas (2ip, BA, KIN) en presencia de AIA.

Por otro lado, el desarrollo de raíces es posible en medios sin suplemento hormonal lo que representa una ventaja puesto que ayuda a disminuir los costos en materiales (Bekheet, 2006; Carhuaricra y col., 2012; Gull y col., 2014; Izquierdo y col., 2016).

Por último, la formación de raíces en sistemas de cultivo *in vitro* de ajo ha sido observada incluso en medios de cultivo con un mayor contenido de sacarosa (8 %), Zely col. (1997) registraron la formación de raíces en medios sin suplemento hormonal o con adición de JA, aunque la presencia de JA disminuyó considerablemente el número de raíces.

Durante esta fase se observó que el éxito en cuanto a supervivencia dependió de la presencia de bulbos previamente formados *in vitro*. En este sentido, luego de 15 días de aclimatación, se registró un 0 % de supervivencia en aquellas vitroplantas sin bulbo, mientras que en vitroplantas con bulbos la supervivencia fue 55,56 %. Además, en aquellas vitroplantas que no sobrevivieron (con y sin bulbos), se notó la presencia previa de hongos al cabo de 4-5 días de aclimatación. Por tal motivo se precedió a rociar con fungicida (Vitavax®) un grupo de 7 vitroplantas con bulbos, obteniéndose una supervivencia de 100 % transcurridos 15 días de aclimatación (Figura 7).

Izquierdoy col. (2002), mostraron que durante la etapa de aclimatación, el porcentaje de supervivencia de cinco clones distintos de ajo en vitroplantas con bulbos fue mayor (90 %) que el registrado en vitroplantas sin bulbos (39,50 % - 49,62 %). Kim y col. (2003) e Izquierdo y col. (2016) reportaron 90 – 100 % de supervivencia durante la fase de aclimatación de vitroplantas de ajo con bulbos formados *in vitro*.

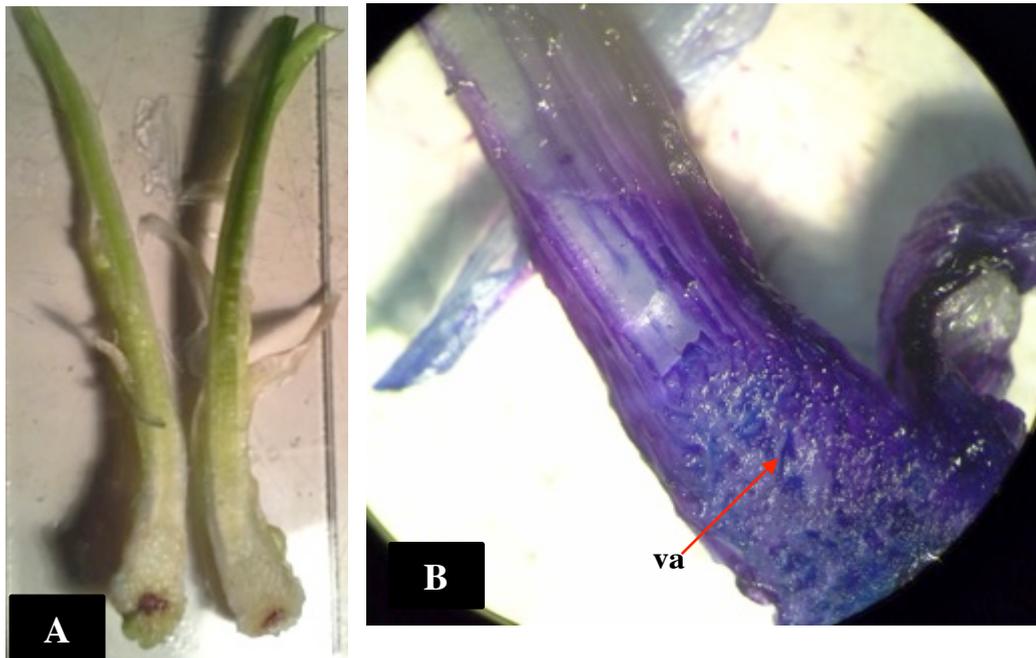


**Figura 7.** Vitroplantas de ajo con bulbos formados *in vitro*, mantenidas en condiciones de vivero luego de 15 días.

## CARACTERIZACIÓN MORFO-ANATÓMICA

### *Edad 1*

Los cortes longitudinales realizados en muestras de edad 1, permitieron corroborar la naturaleza envolvente de las hojas, las cuales se superponen originando un pseudotallo de grosor constante desde su base (punto donde surgen las raíces) (Figura 8A). La posterior tinción con azul de toluidina resaltó la vascularización en el tallo verdadero, con entrenudos muy cortos y del cual parten las hojas (Figura 8B). Las observaciones realizadas en estos explantes, coinciden con las características de una planta joven, donde no se han iniciado cambios morfo-anatómicos como resultado del proceso de bulbificación (Mujica y col., 2008).



**Figura 8.** A) Corte longitudinal de vitroplantas de ajo sin evidencia de bulbificación. B) La tinción de la muestra permite detallar la vascularización en la base del explante (va).

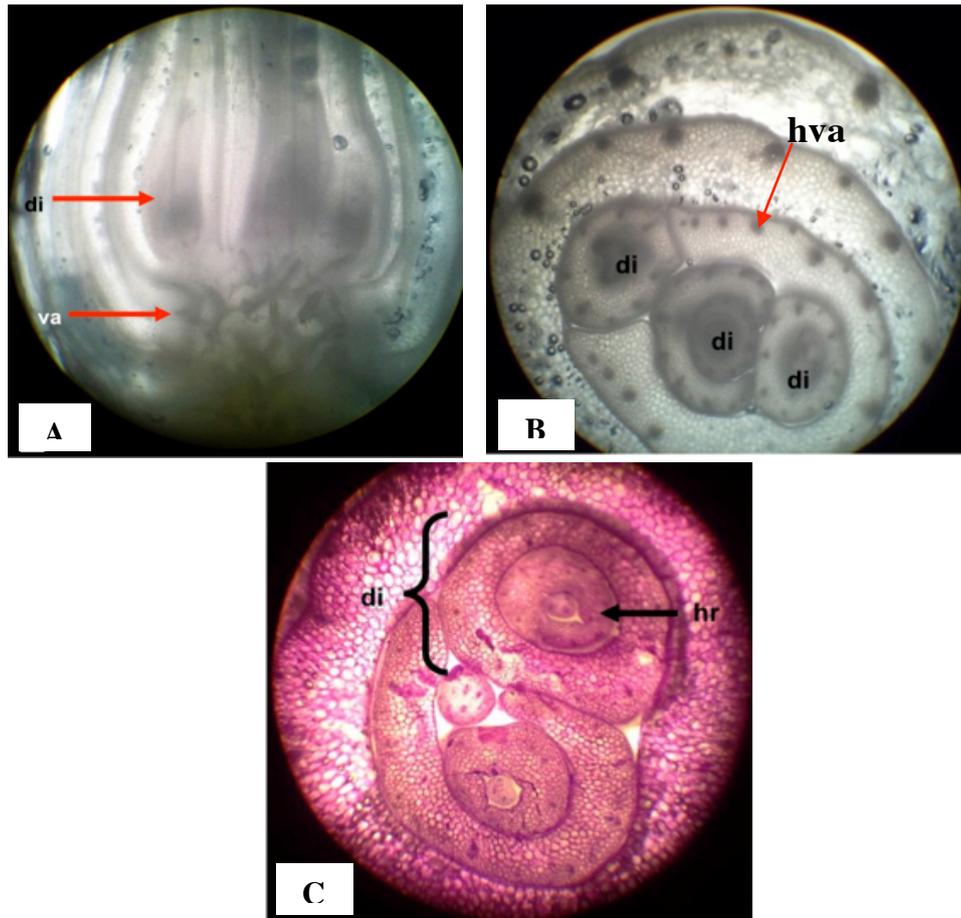
### *Edad 2 y 3*

El material vegetal correspondiente a las edades 2 y 3, mostró características morfológicas y anatómicas similares entre sí. En este sentido, se evidenció el engrosamiento uniforme en la base del pseudotallo, el cual presentó un cambio de color de las túnicas externas pasando de tonalidades verdosas a blancas a medida que avanzó el tratamiento, igualmente la textura de estas hojas se vio modificada. Este cambio de color se debe a la pérdida progresiva de cloroplastos a medida que se alcanza la madurez durante la bulbificación (Mujica y col., 2008; Mann, 1952); mientras que la textura corrugada, deriva de la lignificación de las células de la epidermis, lo que conduce a la formación de una capa celular endurecida (Mann, 1952). El diámetro promedio de los bulbos fue de 0,75 a 0,85 cm en explantes de edad 2 y 3 respectivamente.

Los cortes mostraron el engrosamiento de las hojas más internas, distinguiéndose zonas densas que parecen corresponder a los “dientes” o bulbillos que conformarán al bulbo, los cuales emergen de las yemas axilares de las hojas fértiles (internas). Más aún, el número de zonas densas o núcleos aumentó de 2 a 3 en muestras de edad 3 (en comparación a aquellos de edad 2) (Figura 9).

Estas modificaciones en las hojas, son comparable con los resultados de Mujica y col. (2008) obtenidos en bulbos formados *in vitro* de edad comprendida entre 21-28 días. En similitud a lo reportado por los autores, los bulbos presentan entre 2-3 dientes en proceso de desarrollo; donde la hoja más interna, engrosada y de forma tubular corresponde a la hoja de reserva la cual encierra al meristema apical, y rodeada a su vez por las hojas o túnicas protectoras.

Adicionalmente se observó la vascularización como un continuo desde el tallo hasta las hojas, en la cual los paquetes de haces vasculares se disponían en los márgenes de las hojas, incluso en aquellas engrosadas (modificadas). Lo mismo fue descrito por Mann (1952), quien indica que la vascularización debe observarse aún durante la bulbificación y diferenciación de los dientes de ajo.



**Figura 9.** Bulbificación en vitroplantas de edad 2 y 3. **A)** Corte longitudinal mostrando los dientes en desarrollo (di) y la vascularización del tallo (va) visto bajo lupa. **B)** Cortes transversales mostrando tres dientes en desarrollo (di) y paquetes de haces vasculares (hva) (100x). **C)**Detalle de la hoja de reserva (hr) en muestras teñidas (100x).

#### *Edad 4*

Por último, a diferencia de las muestras anteriores, la parte aérea de las vitroplantas de edad 4 mostraron marchitez en sus extremos apicales; además el bulbo presentó un mayor diámetro promedio (1,10 cm) así como una tonalidad opaca en las hojas o túnica externas.

No obstante, según lo observado en las edades 2 y 3, se esperaba la formación de al menos tres dientes. Sin embargo, los cortes revelaron la formación de un único diente completamente desarrollado y maduro, indicado por la presencia de un meristema o yema axilar en la base del mismo (Figura 10A, B y C). Mujica y col. (2008), indican que el proceso de formación de bulbos *in vitro* abarca dos etapas, una morfogénica y otra de llenado y maduración. En la primera se observa el ensanchamiento de la base del explante, mientras que en la segunda se desarrollan las yemas axilares preformadas.

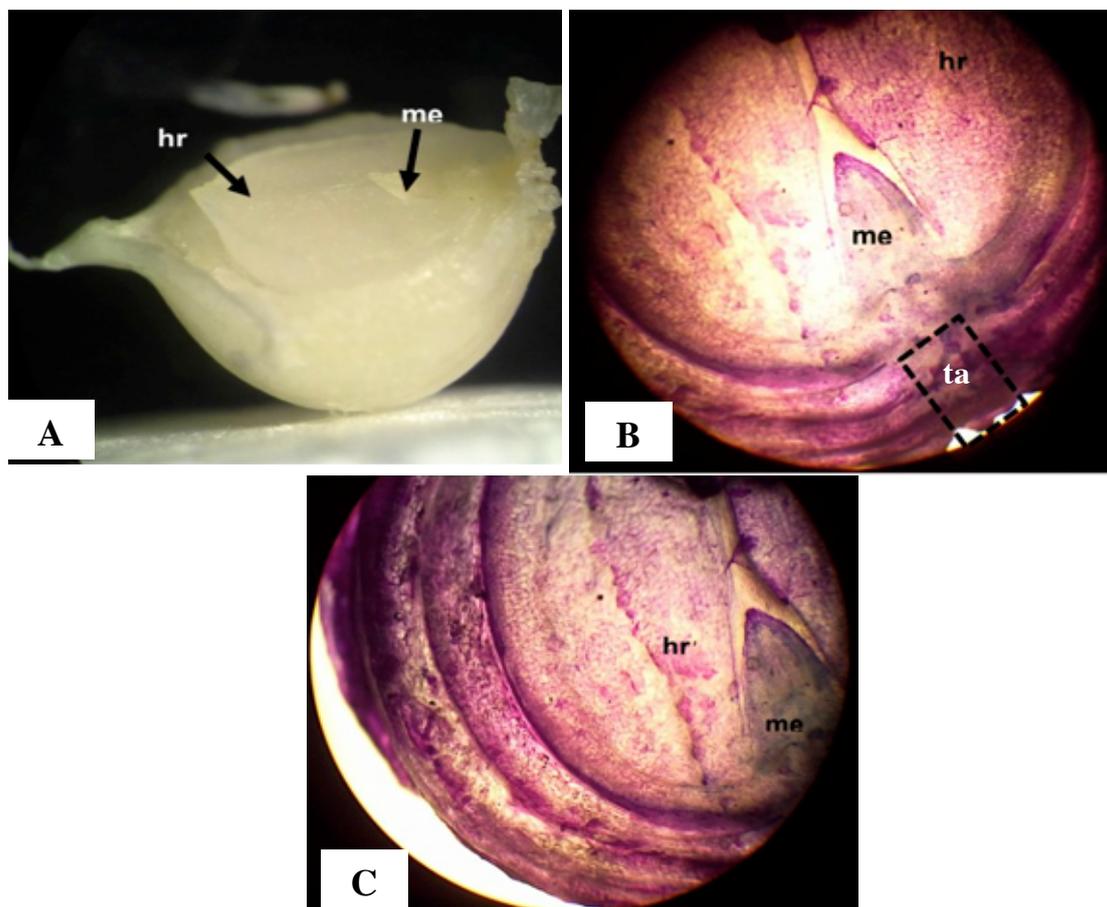
Posteriormente, la tinción de las muestras permitió detallar la presencia de yemas adicionales poco desarrolladas en la base del bulbo (tallo verdadero) (Figura 10B), las cuales se disponían a lo largo del tallo entre las capas medias observándose como un tejido denso y compacto.

Más aún, al manipular el bulbo, fue posible separar las capas que lo conformaban, distinguiéndose un total de cinco capas, donde la más interna (capa 5) de mayor grosor correspondió al diente formado. Lo anterior indica la obtención de tejidos diferenciados y que desempeñan funciones específicas; además las capas observadas, coinciden con los tipos de hojas que componen a un bulbo de ajo formado bajo condiciones *ex vitro* (Mann, 1952; Burba 2003).

La formación de bulbos “unidentados” (compuesto por un único diente) ha sido reportado por Nagakubo y col. (1997), siendo frecuentes en plantas jóvenes y pequeñas o a partir de plantas formadas *in vitro*. En contraste, los bulbos compuestos por múltiples dientes o de tipo “multidentados” son el resultado de la bulbificación en plantas que han alcanzado una talla considerada como madura. Adicionalmente, otros autores han reportado la formación de

bulbos no divisibles o “unidentados” en brotes de ajo durante la etapa de bulbificación *in vitro* (Gull y col., 2014; Ayed y col., 2018), e incluso una vez finalizada la etapa de aclimatación de las mismas (Metwally y col., 2014).

Sin embargo, este fenómeno puede ser revertido al mantener a las plantas con bulbos “unidentados” bajo condiciones de vivero, debido a que la etapa de letargo se encuentra asociada al balance endógeno de promotores e inhibidores de crecimiento (fitohormonas) (Nagakubo y col., 1997; Mujica y col., 2008).



**Figura 10.** Bulbificación en vitroplantas de edad 4. **A)**Corte longitudinal, visto bajo lupa, mostrando un único diente desarrollo con meristema (me) rodeado por la hoja de reserva (hr). **B y C)**Corte transversal mostrando detalle del meristema (me) y la hoja de reserva (hr) que lo rodea, y el tallo verdadero (ta) (100x).

## 6. CONCLUSIONES

- En esta investigación se logró establecer un sistema de propagación *in vitro* de *A. sativum* a partir meristemas aislados de bulbos procedentes de dos localidades del estado Mérida, empleando indistintamente medios con y sin suplemento hormonal.
- La inducción a la formación *in vitro* de bulbos en *A. sativum*, fue posible gracias a la adición una alta concentración de sacarosa (9%) en el medio de cultivo, y en combinación con la acción de la citocinina 2ip promueve la bulbificación múltiple.
- En este trabajo, con el uso de fitohormonas, no fue posible la multiplicación masiva *A. sativum* a partir de meristemas. Sin embargo, se obtuvo la regeneración de microbulbos a partir de segmentos de bulbos en un 62,5 % de los explantes, al emplear medio de cultivo con una alta concentración de sacarosa (9 %).
- Durante las etapas de establecimiento del cultivo y de bulbificación *in vitro* de *A. sativum*, la respuesta del material vegetal de las dos localidades estudiadas, varió en cuanto a la longitud de los brotes y la bulbificación múltiple, siendo mayor los de la localidad del Molino y Mucuchíes respectivamente.
- La formación de raíces se apreció en todas las etapas del cultivo *in vitro* de *A. sativum* e independientemente del suplemento hormonal y la concentración de sacarosa, por lo cual no fue necesario la implementación de medios especiales para el enraizamiento *in vitro* de las plantas.

- Durante la aclimatación de vitroplantas de ajo, la presencia de bulbos formados *in vitro* junto con el uso de fungicida, favoreció una alta tasa de supervivencia al usar como sustrato materia orgánica y arena en proporción 3:1 en comparación a vitroplantas sin bulbos en el mismo sustrato.
- La caracterización morfo-anatómica de los bulbos de ajo formados *in vitro*, reveló la formación de bulbos compuestos por un único diente completamente desarrollado y maduro, no obstante la evidencia histológica demuestra la presencia de yemas adicionales no desarrolladas.

## 7. FINANCIAMIENTO

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en los Laboratorio de Mejoramiento Vegetal y Biotecnología Vegetal, del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela. Se dispuso de las instalaciones, equipos y reactivos de dichos laboratorios en conjunto con el financiamiento otorgado por la Corporación para el Desarrollo Científico y Tecnológico (CODECYT) enmarcado en el proyecto: “Producción de semilla mejorada y certificada de ajo (*Allium sativum* L.); apio criollo (*Arracacia xanthorrhiza*); fresa (*Fragaria ananassa*); cacao (*Theobroma cacao*); café (*Coffea arabica*) y zanahoria (*Daucus carota*)”.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abo El-Nil, M.** (1977). Organogenesis and embryogenesis in callus cultures of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Sci. Lett.* 9: 259-264.
- Acosta-Rodríguez, G.F.; Lujan-Favela, M. y Parra-Quezada, R.A.** (2008). Crecimiento y rendimiento de cultivares de ajo en Delicias, Chihuahua, México. *Agricultura Técnica en México* 34(2): 177-188.
- Ashraf, M.; Aziz, M.; Kadir, M.; Stanslas, J. y Farokhian, E.** (2013). *In vitro* tuberitazion of *Chlorophytum Borivilianum* Sant & Fern (Safed Musli) as influenced by sucrose, CCC and culture system. *Plant Cell Physiol.* 58(8): 1356-1364.
- Ayed, C.; Bayouhd, C.; Rhimi, A.; Mezghani, N.; Haouala, F. y Al Mohandes Dridi, B.** (2018). *In vitro* propagation of Tunisian local garlic (*Allium sativum* L.) from shoot-tip culture. *JPHR* 1(2): 75-86.
- Bekheet, S.** (2006). A synthetic seed method through encapsulation of *in vitro* proliferated bulblets of garlic (*Allium sativum* L.). *Arab J. Biotech.* 9(3): 415-426.
- Burba, J.** (2003). Producción de Ajo. Documento de Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Jornadas de actualización en la producción de ajo, 30 págs.
- Calva, G. y Pérez V.** (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *RDU* 6(11): 2.16-16.16.
- Carhuaricra, K.; Olivera, J.; Gonzales, J. y Rodríguez, J.** (2012). Introducción y multiplicación *in vitro* del cultivo de ajo variedad Morado Barranquino. *Rev. peru. biol.* 19(3): 341-344.
- Chow, Y.; Selby, C. y Harvey, B.** (1992). Stimulation by sucrose of *Narcissus* bulbil formation *in vitro*. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 37(2): 289-293.
- Conci, C.** (2004). Obtención de plantas libres de virus. En *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Editores Echenique V.; Rubinstein C.; Mroginski L. Capítulo 5, páginas 303-312.
- Conci, C.; Cafrune, E.; Lunello, P.; Nome, S. y Perotto, C.** (2004). Producción de plantas de ajo libres de virus. En *Biotecnología y mejoramiento vegetal*. Editores Echenique V.; Rubinstein C.; Mroginski L. Capítulo 6, páginas 313 - 316.
- Córdova, M.** (2010). Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas. Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional.
- Cruz, L.; Peña, L. y Farfán, L.** (2017). Impacto de la alicina como agente microbicida en la sobrevivencia de ratas Wistar con sepsis abdominal comparado con lavado peritoneal con solución fisiológica. *Jóvenes en la ciencia* 3(2): 210-214

- de García, E. y Vargas, T. E.** (2000). Micropropagación clonal masiva de variedades de ajo (*Allium sativum*), con fines comerciales. Memorias del X Congreso Italo Latinoamericano de Etnomedicina, 87-88.
- Duarte, R.; Grijalva, R. y Robles, F.** (2010). Productividad y calidad de variedades de ajo (*Allium sativum* L.) bajo condiciones desérticas en Caborca, Sonora. *BIOtecnica* XII(1): 44-54.
- El-Dawayati, M.; Zaid, Z. y Elsharabasy, S.** (2012). Effect of conservation on steroids contents of callus explants of date palm cv. Sakkoti. *Aust. J. Basic & Appl. Sci.* 65(3): 305-310.
- FAO** (2001). Glosario de Biotecnología para la agricultura y la alimentación. Recuperado el 2 de Abril de 2018 de FAO: <http://www.fao.org>
- FAOSTAT** (2017a). Recuperado el 11 de julio de 2018 de Knoema Production Statistics-Crops, Crops Processed: <http://www.knoema.es>
- FAOSTAT** (2017b). Recuperado el 11 de julio de 2018 de FatcFish: <http://www.factfish.com>
- FDA** (1995). Cultivo de ajo. Fundación de Desarrollo Agropecuario, INC. Boletín Técnico No. 5, páginas 1-19.
- Gad El-Hak, S.; Ahmed, K.; Moustafa, Y. y Ezzat, A.** (2011). Growth and cytogenetical properties of micro-propagated and successfully acclimatized garlic (*Allium sativum* L.) clones with a modified shoot tip culture protocol. *J. Hort. Sci. &Ornamen. Plants* 3(2): 115-129.
- George, E.F. y Debergh, P.C.** (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture* (3a edición ed., Vol. 1). Editorial Springer, España. 479 pp.
- Giménez, M.D.; Yañez-Santos, A.M., Paz, R.C.; Quiroga, M.P.; Marfil, C.F., Conci, V.C. y García-Lampasona, S.C.** (2016). Assessment of genetic and epigenetic changes in virus-free garlic (*Allium sativum* L.) plants obtained by meristem culture followed by *in vitro* propagation. *Springer* 35: 129–141.
- González, H.** (1984). Obtención y propagación de plantas de ajo (*Allium sativum* L.), libres de virus, mediante el cultivo *in vitro* de ápices meristemáticos. Trabajo especial de Grado, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias.
- Gull, I.; Noreen, A.; Aslam, M. y Athar, M.** (2014). Comparative effect of different pythohormones on the micropropagation of *Allium sativum*. *Pak. J. Biochem. Mol. Biol.* 17(1-2): 121-124.
- Harris, J.C.; Cottrell, S.L.; Plummer, S. y Lloyd, D.** (2001). Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Springer*, 57: 282-286.
- Helou, L. y Harris, I.** (2007). Garlic. En *Herbal Products: Toxicology and Clinical Pharmacology* (Forensic Science and Medicine). Editores T. Tracy, R. Kingston. Capítulo 8, páginas 123-149.
- Hernández-Anguiano, A.M.; Juárez, G.; Fucikovsky, L.; Zavaleta-Mejía, E. y González, V.A.** (2006). Impacto del almacenamiento en la brotación de bulbos de ajo y especies patógenas de *penicillium* y *erwinia* asociadas. *RFM* 29(4): 283-290.

- INIA** (2005). El Cultivo de Hortalizas en Venezuela. Serie Manuales de Cultivo N° 2. Documento del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, páginas 121-137.
- ITIS** (2018). Integrated Taxonomic Information System. Recuperado el 26 de marzo de 2018 de Integrated Taxonomic Information System on-line database: <https://www.itis.gov>
- Izquierdo, H.; Disotuar, R.; González, M. y González, S.** (2016). Micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.) and determination of the genetic stability of the plantlets obtained by AFLP markers. *Biotecnol.Apl.*33: 4211-4218.
- Izquierdo, H.; Quiñones, Y.; Disotuar, R. y Pedroso, D.** (2002). Evaluación de diferentes sustratos en la aclimatización de vitroplantas y microbulbillos de ajo (*Allium sativum* L.). *Cultivos Tropicales* 23 (3): 63-69.
- Jiménez, E.** (1998b). Cultivo de ápices y meristemos. En *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. Editor J. Pérez. Capítulo 3, páginas 45-56.
- Jiménez, E.A.** (1998a). Generalidades del cultivo *in vitro*. En *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Editor J. Pérez. Capítulo 1, páginas 13-24.
- Kahn, N.; Alam, M. y Nath, U.** (2004). *In vitro* regeneration of garlic through callus culture. *J. Biol. Sci.* 4(2): 189-191.
- Kästner, U.; Klahr, A.; Keller, E. y Kahane, R.** (2001). Formation of onion bulblets *in vitro* and viability during medium-term storage. *Plant Cell Rep.* 20(2): 137-142.
- Keller, E. y Senula, A.** (2013). Micropropagation and cryopreservation of garlic (*Allium sativum* L.). En *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants* (vol. 994): *Methods in Molecular Biology*. Editores M. Lambardi, E. Ozudogru, S. Jain. Páginas 353-368.
- Keller, E.; Zanke, C.D.; Senula, A.; Breuing, A.; Hardeweg, B. y Winkelmann, T.** (2013). Comparing costs for different conservation strategies of garlic (*Allium sativum* L.) germplasm in genebanks. *Genet. Resour. Crop Evol.* 60: 913-926.
- Khalid, A.; De-ping, G. y Zhu-jun, Z.** (2001). Effect of growth regulators on plantlet regeneration and bulbing in onion (*Mum cepa* L.) *in vitro*. *PJBS* 4(3): 374-377.
- Khan, M; Alam, M y Nath U.** (2004). *In vitro* regeneration of garlic through callus culture. *J. Biol. Sci.* 4(2): 189-191.
- Kim, E.; Hahn, E.; Murthy, H. y Paek, K.** (2003). High frequency of shoot multiplication and bulblet formation of garlic in liquid cultures. *PCTOC* 73(2): 231-236.
- Krikorian, A.D.** (1993). Propagación clonal *in vitro*. En *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. Editores W. Roca, L. Mroginski. Capítulo 5, páginas 95-125.
- Lanzotti, V.; Bonanomi, G. y Scala, F.** (2013). What makes *Allium* species effective against pathogenic microbes?. *Springer* 12: 751-772.
- López, L.; Escobar, H. y Parra, M.** (2014). Establecimiento de plántulas *in vitro* de clones de ajo peruano (*Allium sativum* L.). *MUTIS* 4 (1): 62-66.

- Luciani, G.** (2001). Estudios de bulbificación en ajo (*Allium sativum* L.) mediante técnicas de cultivo *in vitro* y su posible aplicación en la producción de ajo semilla. Tesis Magister, Universidad Nacional del Sur, Facultad de Ciencias Agrarias.
- Maldonado, P.** (2003). Propagación *in vitro* de meristemas de *Allium sativum* L. Proyecto de propagación y mejoramiento de frutales de hoja caduca, 65-92.
- Mann, L.K.** (1952). Anatomy of the garlic bulb and factors affecting bulb development. Hilgardia 21 (8): 195-251.
- Mateo-Sagasta, L.M.** (1990). Historia. En Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Editor Mundi Prensa Libros S.A. Capítulo 3, páginas 29-34.
- Metwally, E.; El-Denary, M.; Dewir, Y. y Naidoo, Y.** (2014). *In vitro* propagation of garlic (*Allium sativum* L.) through adventitious shoot organogenesis. Afr. J. Biotechnol. 13(38): 3892-3900.
- Monrroy, V.** (2009). Efecto de la variación de medios y concentraciones de sacarosa en la multiplicación de microbulbificación *in vitro* de ajo (*Allium sativum* L.) para de semillas de alta calidad. Tesis de Grado, Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Agronomía.
- Mujica, H.; Sanabria, M.E.; Mogollón, N. y Perozo, Y.** (2008). Formación *in vitro* del bulbo de ajo morado (*Allium sativum* L.). Rev. Fac. Agron. (LUZ) 25: 197-210.
- Mujica, H.** (2012). Crecimiento, desarrollo, producción y calidad del ajo (*Allium sativum* L.) en respuesta a la densidad de siembra y la nutrición potásica. Tesis Doctoral, Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía.
- Mujica, H. y Mogollón, N.** (2004). Bulbificación *in vitro* del ajo (*Allium sativum* L.) con adición de citocininas y sacarosa en el medio de cultivo. Bioagro 16(1): 55-60.
- Nagakubo, T.; Takaichi, M. y Oeda, K.** (1997). Micropropagation of *Allium sativum* L. (Garlic). En Biotechnology in Agriculture and Forestry (vol. 39). High-Tech and Micropropagation V. Editor Y. Bajaj. Capítulo 1, páginas 3-19.
- Ncube, B. ;Finnie, J. y Van Staden, J.** (2014). *In vitro* regeneration of *Cyrtanthus* species: ornamental plants with medicinal benefits. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 51(1): 42-51.
- Orellana, P.** (1998). Propagación vía organogénesis. En Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Editor J. Pérez. Capítulo 9, páginas 151-178.
- Panattoni, A.; Luvisi, A. y Triolo, E.** (2013). Review: Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. Span. J. Agric. Res. 11(1): 173-188.
- Pardo, A.; Hernández, A.; Méndez, N. y Alvarado, G.** (2015). Análisis genético, mediante marcadores RAPD, de microbulbos de ajo conservados e irradiados *in vitro*. Bioagro 27(3): 143-150.
- Pardo, A.; Luna, F. y Hernández, N.** (2011). Regeneración *in vitro* de *Allium sativum* L. a partir de segmentos de hojas y raíces. Bioagro 23(3): 207-214.
- Pardo, A.; Rivero, S. y Alvarado, G.** (2014). Conservación *in vitro* de microbulbos de ajo (*Allium sativum* L.). Bioagro 26(2): 115-122.

- Pérez-Moreno, L.; Santiago-Gómez, D.; Rico-Jaramillo, E.; Ramírez-Malagón, R. y Mendoza-Celedón, B.** (2008). Efecto de Virus Fitopatógenos Sobre Características Agronómicas y Calidad del Ajo (*Allium sativum* L.), en el Estado de Guanajuato, México. R. Mex. Fit. 26(1): 40-48.
- Podwyszyńska, M.; Novák, O.; Doležal, K. y Strnad, M.** (2014). Endogenous cytokinin dynamics in micropropagated tulips during bulb formation process influenced by TDZ and iP pretreatment. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 119(2): 331-346.
- Ramírez-Concepción, H. R.; Castro-Velasco, L.N. y Martínez-Santiago, E.** (2016). Efectos Terapéuticos del Ajo (*Allium sativum* L.). Salud y Administración 3(8): 39-47.
- Robledo-Paz, A.; Villalobos-Arámbula, V. y Jofre-Garfias, A.** (2000). Efficient plant regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by root-tip culture. In Vitro Cell. Dev. Biol. 36: 416-419.
- Rossi, A.; Abdala, G.; Tizio, R.; Corral, M. y Grosso, L.** (1997). Possible involvement of jasmonic acid in bulb forming of garlic (*Allium sativum* L.). Acta Hort. 433: 381-388.
- Roth, I.** (1980). Organografía comparada de plantas superiores.
- Royal Botanic Gardens** (2017). Recuperado el 26 de marzo de 2018 de KEW Science, Plants of the World Online portal: <http://powo.science.kew.org>
- Salisbury, B.; Ross, C. y Alonso, J.** (2000). Fisiología de las plantas (vol. 3). Desarrollo de las plantas y fisiología ambiental. Editorial Paraninfo, España. 480 pp.
- Santos, A.; Fidalgo, F. y Santos, I.** (2006). *In Vitro* Propagation of *Hyacinthus orientalis* cv. *Jan Boss* from Bulb Twin-Scale Explants. FOPB2: 561-563.
- Seabrook, J.** (1993). *In vitro* propagation and bulb formation of garlic. Can. J. Plant Sci. 155-158.
- Sendl, A.** (1995). *Allium sativum* and *Allium ursinum*: Part 1. Chemistry, analysis, history, botany. Phytomedicine 4: 323-339.
- Shahidul, M.; Wada, T. y Hattori, K.** (2003). Shoot regeneration and bulblet formation from shoot and root meristem of garlic cv. Banglades local. Asian J. Plant Sci. 2(1): 23-27.
- Shahzad, A.; Yadav, V. y Ahmad, Z.** (2016). Plant Tissue Culture: Profile of Pioneers. Biotechnological strategies for the conservation of medicinal and ornamental climbers. Editores A. Shahzad, S. Siddiqui, S. Sharma. Capítulo 5, páginas 141-162.
- Slabbert, M.; Bruyn, M.; Ferreira, D. y Pretorius, J.** (1993). Regeneration of bulblets from twin scales of *Crinum macowanii* *in vitro*. PCTOC 33: 133-141.
- Staikidou, I.; Watson, S.; Harvey, B. y Selby, C.** (2005). Narcissus bulblet formation *in vitro*: Effects of carbohydrate type and osmolarity of the culture medium. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 80(3): 313-320.
- Taha, L.; Sayed, S.; Farahat, M. y El-Sayed, I.** (2018). Research Article *In vitro* Culture and Bulblets Induction of Asiatic Hybrid Lily ‘Red Alert’. J. Biol. Sci. 18(2): 84-91.

- Taskin, H.; Baktemur, G.; Kurul, M. y Büyükalaca, S.** (2013). Use of tissue culture techniques for producing virus-free plant in garlic and their identification through real-time PCR. *Sci. World J.* 2013: 1-5.
- UniProt** (2018). Recuperado el 26 de marzo de 2018 de The Universal Protein Resource, Supporting data, taxonomy: <https://www.uniprot.org>
- Uranbey, S.** (2010). Stimulating effects of different basal media and cytokinine types on regeneration of endemic and endangered *Muscari aucheri*. *Arch. Biol. Sci.* 62(3): 663-667.
- Vargas, T.E.; Oropeza, M. y de García, E.** (2006). Propagación *in vitro* de *Hippeastrum* sp. *Agronomía Trop.* 56(4): 621-626.
- Vieira, R.; da Silva, A.; Zaffari, G. y Feltrim, A.** (2014). *In vitro* morphogenesis of garlic plants: The role of growth regulators in bulb induction and development. *Ciência Rural* 44(3): 439-445.
- Yan, M.; Xu, C.; Kim, C.; Um, Y.; Bah, A. y Guo, D.** (2009). Effects of explant type, culture media and growth regulators on callus induction and plant regeneration of Chinese jiaotou (*Allium chinense*). *Sci. Hortic.* 123: 124-128.
- Zel, J.; Debeljak, N.; Ucman, R. y Ravnikar, M.** (1997). The effect of jasmonic acid, sucrose and darkness on garlic (*Allium sativum* L. cv. *Ptujski jesenski*) bulb formation *in vitro*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 33: 231-235.
- Zheng, S.; Henken, B.; Krens, F. y Kik, C.** (2003). The development of an efficient cultivar-independent plant regeneration system from callus derived from both apical and non-apical root segments of garlic (*Allium sativum* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 39: 288-292.