

Formación *in vitro* del bulbo del ajo morado (*Allium sativum* L.)

In vitro formation of purple garlic (*Allium sativum* L.) bulb

H. Mujica¹, M.E. Sanabria², N. Mogollón² y Y. Perozo

¹Universidad Pedagógica Experimental "Libertador", Instituto Pedagógico de Barquisimeto; Departamento de Educación Técnica Agropecuaria.

²Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado"; Postgrados de Agronomía; Laboratorio de Microtecnia e Histopatología Vegetal y Laboratorio de Cultivo *in vitro*.

Resumen

Para estudiar la bulbificación *in vitro* del ajo morado (*Allium sativum* L.) se extrajeron ápices caulinares de los "dientes" del bulbo previamente gelados y desinfectados. Estos ápices se cultivaron en el medio de Murashige y Skoog con 2,0 mg.L⁻¹ de 2 isopenteniladenina (2ip); 0,1 mg.L⁻¹ de ácido naftalenoacético (ANA) y 30 g.L⁻¹ de sacarosa. Los cultivos crecieron a 41,54 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de luminosidad, fotoperíodo de 16 horas luz y 23 \pm 2°C. Las vitroplantas regeneradas fueron seccionadas a 2 cm de longitud desde la corona de la planta, se eliminaron sus raíces y se cultivaron en un medio para inducir la bulbificación, constituido por los mismos componentes anteriores, excluyendo el ANA y aumentando la sacarosa a 90 g.L⁻¹. Para los estudios histológicos se realizaron cinco muestreos de tres vitroplantas cada uno, entre los 0 y 28 días de cultivo. En la bulbificación *in vitro* se distinguieron dos etapas de desarrollo. La primera correspondió al estado morfogénico iniciado desde el día 0 hasta los 20 días de cultivo, y la segunda, al llenado y maduración del bulbo a partir del día 7 de la inducción a la bulbificación. El bulbo se desarrolló por organogénesis directa, siendo su estructura similar al de cebolla hasta los 21 días, para luego diferenciarse por la formación de los "dientes". Las raíces adventicias se originaron de los meristemas en una región cerca al ápice del tallo.

Palabras clave: cultivo *in vitro*, ajo morado, histología, bulbificación.

Recibido el 10-6-2005 • Aceptado el 1-11-2007

Autor de correspondencia e-mail: hmujicar@yahoo.com; mesanabria@ucla.edu.ve; norcam@intercable.net.ve

Abstract

With the purpose of studying the *in vitro* bulb formation of the purple garlic (*Allium sativum* L.) shoot tips of the "teeth" of the bulbs were extracted, sprouted, and disinfected. These shoot tips were cultivated in Murashige and Skoog medium with 2.0 mg.L⁻¹ of isopentenadenine (2ip); 0.1 mg.L⁻¹ of naphthalene acetic acid (ANA) and 30 g.L⁻¹ of sucrose. The cultures grew up at 41.54 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ luminosity, 16 hours of light, and 23 \pm 2°C. The *in vitro* regenerated plants were cut off at 2 cm of length from the plant neck; their roots were cut off and cultivated in a bulb-formation medium, made up from similar components, but excluding the ANA and incrementing the sucrose to 90 g.L⁻¹. For histological studies, five samplings of three *in vitro* plants each were conducted between the 0 to the 28 day of culture. In the *in vitro* bulb formation, two stages of development were observed. The first one corresponding to the morphological stage initiated from the 0 to the 20 day of culture, and the second one, to the filled and maturity begun on the 7 day of the bulb-formation induction. The bulb developed by direct organogenesis, presenting an onion-like structure until the 21 day, differentiating later on by its "teeth" formation. The adventitious roots originated from the meristems in a region near the apex of the stem.

Key words: *in vitro* culture, purple garlic, histology, bulb formation.

Introducción

El ajo (*Allium sativum* L.) es una planta herbácea constituida por un bulbo subterráneo, formado por "dientes" unidos en su base alrededor del tallo verdadero y recubiertos por catáfilos blancos o morados, cuya tonalidad varía según la variedad y la altura del sitio de siembra (Ramos, 1991). Las hojas son alargadas, planas y envainadoras; las flores de color rosado o verde y no producen semillas. El falso tallo es blando, liso y de hasta 40 cm de longitud, de donde nacen bulbillos aéreos. El sistema radical consta de numerosas raíces adventicias simples, delgadas y poco ramificadas que crecen superficiales en el suelo. Las especies de este género presentan el mismo patrón básico

Introduction

Garlic (*Allium sativum* L.) is an herbaceous plant formed by an underground bulb, with "teeth" grouped in a basement around true stem and recovered by white or purple cataphyll, whose tone varies according variety and height of sowing place (Ramos, 1991). Leaves are enlarged, flats and veined; flowers of pink or green color and they do not produce seeds. Pseudo-stem is soft, smooth and until 40 cm length, from where aerial bulblet. The root system have numerous simple adventitious roots, thin and little ramified that grows superficially in soil. Species of this genus shows the same basic pattern of apical growth; both in root and in stem and frequency of

de crecimiento apical, tanto en la raíz como en el tallo y la frecuencia de ramificación del brote apical varía con la especie, el cultivar y las condiciones de crecimiento (Brewster, 1994).

Las diversas metodologías tradicionales utilizadas para los estudios histológicos, han contribuido significativamente en la comprensión de la formación de nuevos individuos propagados por cultivo *in vitro*, ya que permiten observar los cambios morfológicos y anatómicos que ocurren en el tejido experimental. Además, proveen ideas de los procesos celulares que permiten proponer hipótesis para futuras investigaciones (Yeung, 1999).

Los procesos morfogenéticos en los cuales se logra la propagación *in vitro* son variables y dependen principalmente de la relación auxinal/citocinina (Him y Páez de Cásares, 1998). Considerando que el desarrollo de brotes *in vitro* tiene alguna variación epigenética, es conveniente realizar estudios histológicos para conocer el origen de los órganos regenerados y también observar los diferentes cambios anatómicos que ocurren durante la organogénesis (Valverde *et al.*, 1992).

Ayabe y Sumi (1998) realizaron estudios histológicos de tallo de ajo y observaron que el desarrollo del brote estaba dividido en cuatro etapas: expansión de la zona rodeada por la parte basal de los primordios foliares, formación de las yemas axilares en forma de domo, diferenciación de la yema directamente de cada domo y el desarrollo del brote. Estos mismos autores señalaron que la formación celular interna y del domo fue similar a la del ápice caulinar.

ramification of the apical shoot vary with specie, cultivar and growing conditions (Brewster, 1994).

Different traditional methodologies used for the histological studies, have contributed in a significant way on the understanding of formation of new individual propagated by *in vitro* culture, because they permit to observe the morphological anatomic changes that occurs in the experimental tissue. Also, they provide idea about the cellular processes that permit to propone hypothesis for next researches (Yeung, 1999).

The morphogenetic process in which *in vitro* propagation is achieved is variables and principally depends on auxine/cytokinin relationship (Him y Páez de Cásares, 1998). By considering that developing of *in vitro* buds has any epigenetic variation, it is convenient to accomplish histological studies for knowing the origin of regenerated organs and also, to observe different anatomic changes that occurs during organogenesis (Valverde *et al.*, 1992).

Ayabe and Sumi (1998) made histological studies of garlic stem and they observed that bud development was divided into four stages: expansion of zone rounded by the basal part of the foliar primordial, axillary buds formation like dome-shaped, differentiation of the bud directly of each dome-shaped and shoot development. These authors said that the internal cellular formation and of dome-shaped was similar to the cauline apex.

Histological evaluations in floral explants (*Tulipa gesneriana* L.),

Evaluaciones histológicas en explantes florales de tulipán (*Tulipa gesneriana* L.), demostraron que la formación de brotes adventicios se inició a partir de las primeras dos capas celulares subepidérmicas y un número de células del explante original contribuyó a la formación de los mismos (Wilmink *et al.*, 1995).

Considerando lo anteriormente planteado, el objetivo de esta investigación consistió en identificar los cambios morfológicos e histológicos que ocurrieron durante la formación del bulbo de ajo morado (*Allium sativum* L.) desarrollado *in vitro*.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se utilizaron bulbos de ajo tipo morado cosechados en estado de madurez, provenientes del caserío Volcancito, Municipio Crespo, Estado Lara, ubicado a 1500 msnm y con temperatura media anual de 20 a 25°C. Dichos bulbos fueron disgregados en sus respectivos "dientes" y se mantuvieron bajo refrigeración (8 a 10°C) durante 15 días para estimular el proceso de gelación.

Propagación *in vitro*

Después que los "dientes" alcanzaron la gelación, se les eliminó la túnica protectora externa, y posteriormente, se desinfectaron sumergiéndolos en una solución de Betadine® (2%), Kasumin® (20%) e Hipoclorito de sodio (i.a. 5,25%) al 20%, durante 20 minutos en cada uno. Después de cada desinfectante, los propágulos se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

Bajo la cámara de flujo laminar (IAS-Burbank®) y con la ayuda de un

showed formation of adventitious shoots begin from the first two cellular layer sub-epidermal and a cells number of the original explant contributed to its formation (Wilmink *et al.*, 1995).

When considering the previously established, the purpose of this research consisted on identify the morphological and histological changes that happened during the bulb formation of purple garlic (*Allium sativum* L.) developed *in vitro*

Materials and methods

Vegetable material

Garlic bulbs of purple type, harvested in maturity stage were used, coming from Volcancito, Crespo municipality, Lara state, located at 1500 msnm and with an annual mean temperature of 20 to 25°C. These bulbs were dispersed in its respective "teeth" and they were maintained under refrigeration (8 to 10°C) during 15 days for stimulating the shooting process.

In vitro propagation

After "teeth" reached shooting, the external protector tunic, and they were consequently disinfected by immersion in a Betadine® solution (2%), Kasumin® (20%) and sodium hypo chloride (i.a. 5.25%) to 20%, during 20 min in each of them. After each disinfectant, propagules were washed three times with sterile distilled water.

Under the laminar flux camera (IAS-Burbank®) and with the assistance of a stereoscopic microscope (Wild-MSA®), the disinfected garlic "teeth" were transversally half sectioned, with the purpose of showing

microscopio estereoscópico (Wild-MSA®), los "dientes" de ajo desinfectados se seccionaron transversalmente en la mitad, a fin de exponer el ápice caulinar en crecimiento. Posteriormente se eliminaron las hojas envainadoras, extrayendo el domo meristemático con dos primordios foliares. El explante obtenido, de 2,0 mm de longitud aproximadamente, se colocó en una solución de Hipoclorito de sodio al 1% durante 5 minutos y luego se enjuagó tres veces con agua destilada estéril, antes de su cultivo en tubos de ensayo contentivos del medio nutritivo.

Para la obtención de las vitroplantas, el medio empleado estuvo constituido por las sales minerales de Murashige y Skoog (1962), suplementado con 2 isopenteniladenina (Zip) 2,0 mg.L⁻¹; ácido naftalenacético (ANA) 0,1 mg.L⁻¹; tiamina 0,1 mg.L⁻¹; ácido nicotínico 0,5 mg.L⁻¹; piridoxina 0,5 mg.L⁻¹; inositol 100 mg.L⁻¹, 30 g.L⁻¹ de sacarosa y 8 g.L⁻¹ de agar. Este medio se dispensó en tubos de ensayo (25 x 150 mm) en alícuotas de 20 mL por tubo, esterilizándolo en autoclave por 15 minutos a 121°C y 15 lb.pul⁻² de presión. Para el crecimiento y desarrollo de los explantes, los cultivos se colocaron en un cuarto de crecimiento a 41,54 μmol.m⁻².s⁻¹ de luminosidad, bajo un fotoperíodo de 16 h diarias y 23 ± 2°C, durante treinta días.

Bulbificación *in vitro*

Las vitroplantas obtenidas en la fase anterior fueron empleadas para inducir la bulbificación *in vitro*. Al respecto, se seleccionaron aquellas que habían alcanzado un desarrollo adecuado (6 a 12 cm de longitud), y bajo la cámara de flujo laminar, los

the growing cauline apex. Subsequently, they limited the sheathing leaves, by extracting the meristematic dome-shaped with two floral primordia. Explant obtained, of 2.0 mm length approximately, was placed on a solution of sodium hypochlorite to 1% during 5 min and after was washed three times with sterile distilled water, before its cultivation in essay tubes having the nutritive medium.

For the vitro plants obtaining, medium used was formed by the mineral salts of Murashige and Skoog (1962), supplemented with 2 isopenteniladenine (Zip) 2.0 mg.L⁻¹; naftalenacetic acid (ANA) 0.1 mg.L⁻¹; thiamine 0.1 mg.L⁻¹; nicotinic acid 0.5 mg.L⁻¹; pyridoxine 0.5 mg.L⁻¹; inositol 100 mg.L⁻¹, 30 g.L⁻¹ of sucrose and 8 g.L⁻¹ of agar. This medium was dispersed in essay tubes (25 x 150 mm) in aliquots of 20 mL tube, by sterilizing it on autoclave during 15 min to 121°C and 15 lb.pul⁻² of pressure. For the explants growing and development, culture was placed on a growing chamber at 41.54 μmol.m⁻².s⁻¹ light, under a daily photoperiod of 16 h and 23 ± 2°C, during thirty days.

***In vitro* bulb formation**

Vitro plants obtained in previous phase were used for induce the *in vitro* bulb formation. On this respect, those that had reached an adequate developed were selected (6 to 12 cm length), and under the laminar flux camera, buds were selected at 2 cm length from the plant neck and its roots were eliminated. These explants were cultivated in flasks of 250 mL having 20 mL of the

brotos fueron seccionados a 2 cm de longitud desde la corona de la planta y eliminadas sus raíces. Estos explantes se cultivaron en frascos de 250 mL contentivos de 20 mL del medio inductor de la bulbificación, previamente esterilizado en las mismas condiciones descritas para la micropropagación.

El medio para inducir la bulbificación *in vitro* estuvo constituido por los mismos componentes que el anterior, excluyendo el ANA y aumentando la sacarosa de 30 a 90 g.L⁻¹. Los cultivos se colocaron en un cuarto de crecimiento a 61,58 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de luminosidad, bajo un fotoperíodo de 16 h diarias y 23 \pm 2°C, durante 60 días.

Estudio histológico

Las plantas inducidas a bulbificar *in vitro* fueron muestreadas desde el día 0 hasta el día 28, a intervalos de siete días, para un total de cinco muestreos, extrayendo en cada uno de ellos, tres vitroplantas del medio de cultivo. En los dos primeros muestreos se eliminó la parte aérea de las vitroplantas, seccionándolas a 2 cm desde el cuello de la misma; mientras que a partir del día 14 se cortaron por encima del cuello del bulbo (3 a 4 cm aproximadamente). Estos materiales fueron fijados en F.A.A. (formol: alcohol: ácido acético 70%) por un período mínimo de 24 h (Cutter, 1978). Posteriormente se deshidrataron en una batería creciente de glicerina:agua, desde 20 a 100% y luego en otra batería decreciente de etanol-xilol, desde 100 a 25% (Torres y Mogollón, 1997).

Las muestras fueron incluidas en Paraplast X-Trac® a 56°C, por 24 horas en la estufa. Los bloques con las

inducing medium of bulb formation, previously sterilized in the same conditions described for micro propagation.

The inducing medium of the *in vitro* bulb formation was formed by the same components that the previous one, by excluding the ANA and increasing sucrose of 30 to 90 g.L⁻¹. Crops was placed in a growing chamber at 61.58 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ light, in a photoperiod of 16 h daily and 23 \pm 2°C, during 60 days.

Histological study

The induced plants to form *in vitro* bulb formation were sampled from day 0 to day 28, at interval of seven days for a total of five samplings, by extracting in each of them, three vitro plants of cultivation medium. In the two first samplings the aerial part of vitro plants was eliminated, by choosing at 2 cm from the neck; whereas from day 14 they were cut above bulb neck (3 to 4 cm approximately). These materials were fixed F.A.A. (formalin: alcohol: acetic acid 70%) during a minimum period of 24 h (Cutter, 1978). They were dehydrated in a growing battery of glycerin: water, from 20 to 100% and after in other decreasing battery of ethanol-xylol from 100 to 25% (Torres and Mogollón, 1997).

Samples were included in Paraplast X-Trac® at 56°C, during 24 hours in oven. Blocks with structures were transversal and longitudinally sectioned at 20mM with a displacing microtome (Leica® model 820) and tincture was made in a direct, total, supravital and panchromatic way with eosin at 2%. Sections were observed, photographed and described

estructuras se seccionaron transversal y longitudinalmente a 20 mM con un micrófono de desplazamiento (Leica® modelo 820) y la tinción se realizó de forma directa, total, supravital y pancromática con Eosina al 2%. Las secciones se observaron, fotografiaron y describieron bajo un microscopio óptico (Olympus® BX40).

Resultados y discusión

El estudio de los cambios histológicos que ocurrieron durante la formación *in vitro* del bulbo de ajo permitió distinguir dos etapas de desarrollo. La primera correspondió al estado morfogénico iniciada desde el establecimiento de los brotes seccionados a 2 cm desde la corona de la planta (día 0), hasta 20 días después de cultivados en el medio de inducción a la bulbificación. Esta etapa se caracterizó por el comienzo de la producción de hojas envainadoras desde el meristemo apical y por un ligero ensanchamiento de la base del brote (figura 1A). La segunda etapa correspondió al llenado y maduración del bulbo, lo cual se observó después del séptimo día de cultivo en el medio de inducción a la bulbificación. Ésta se caracterizó por el crecimiento de las yemas preformadas, ubicadas en las axilas de las hojas. Cada yema formó un "diente" del bulbo, continuando su desarrollo hasta los 60 días (figuras 1B y 1C).

El llenado del bulbo se produjo por la acumulación de fotoasimilados y nutrientes en las hojas envainadoras, contribuyendo al engrosamiento del mismo. También se observó que en esta segunda etapa,

under a optical microscope (Olympus® BX40).

Results and discussion

Study about histological changes that occur during the *in vitro* bulb formation permitted to distinguish two development stages. The first one corresponded to the morphogenic state initiated from the buds establishment sectioned at 2 cm from the plant neck (day 0) to 20 days after cultivation in the inducing medium for the bulb formation. This stage was characterized by the production beginning of sheathing leaves from the apical meristem and by a light enlarging of the bud base (figure 1A). The second stage corresponded to the filled and maturity of bulb, which was observed after seventh crop day in the inducing medium to the bulb formation. This was characterized by the preformed buds growing, placed in the leaves axil. Each bud formed a "teeth" of bulb, following its development until 60 days (figure 1B and 1C).

The bulb filled was produced by the accumulation of photo assimilates and nutrients in the sheathing leaves, by contributing to its thickened. Also, in the second stage, the leaves production continued from the central apical meristem, placed in stem as a dish way and the root primordia formation from meristems. These results were similar to those obtained by Goleniowski *et al.*, (2001), when establishing the same stages showed a maximum activity of soluble peroxidase in the morphogenic stage and the presence of ionic peroxidase

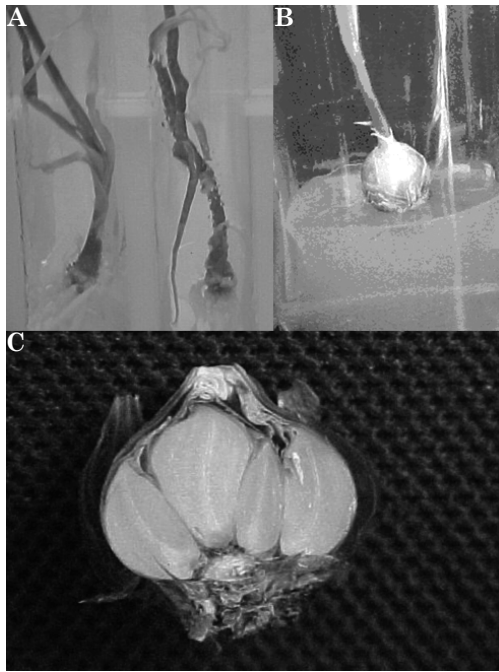


Figura 1. Cambios morfológicos observados durante la formación *in vitro* del bulbo de ajo (*Allium sativum* L.) tipo morado. (A) etapa morfológica y (B y C) etapa de llenado y maduración del bulbo.

Figure 1. Morphological changes observed during *in vitro* formation of garlic (*Allium sativum* L.) bulb, purple type (A) morphogenic stage and (B and C) fill stage and bulb maturation.

continuó la producción de hojas desde el meristemo apical central, ubicado en el tallo en forma de disco y la formación de primordios de raíces a partir de los meristemos. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Goleniowski *et al.*, (2001), al señalar las mismas etapas, e indicaron una máxima actividad de la peroxidasa soluble en la etapa morfológica y la presencia de peroxidases iónicas durante el llena-

during the bulb filled, which were explained as the result of the photo assimilates accumulation process.

From the beginning of bulb development (day 7), this showed a similar structure to those described in onion (Brewster, 1994), it means, seven sheathing leaves that recover the meristematic apex placed in the stem center. The buds differentiation of axillary buds that later would form the "teeth", but if vascular bundle

do del bulbo, lo cual explicaron como el resultado del proceso de acumulación de fotoasimilados.

Desde los inicios del desarrollo del bulbo (día 7), éste presentó una estructura similar a la descrita en cebolla (Brewster, 1994), es decir, siete hojas envainadoras recubriendo el ápice meristemático ubicado en el centro del tallo. No se observó la diferenciación de las yemas axilares que formarían más tarde los "dientes", pero si se detallaron los haces vasculares en las hojas externas, así como sus 6 a 7 capas de tejido parenquimático correspondientes al mesófilo (figura no mostrada).

En la figura 2 se presentan los cambios anatómicos que ocurrieron durante el proceso de desarrollo del bulbo. En el día 0, las secciones mostraron la típica organización anatómica de tallo, observándose el meristemo apical conformado por dos zonas: una externa que corresponde a la *túnica* y otra interna al *corpus*. La primera, constituida por una capa de células que envolvió al *corpus*, se dividió de manera anticlinal, y la segunda, por una masa de posición central cuyas células se dividieron anticlinal y periclinalmente (figura 2A). Estos patrones de división proporcionaron al ápice cambios cíclicos durante la formación de los primordios foliares. Inicialmente apareció como un pequeño domo que se alargó gradualmente, y luego formó una protuberancia alterna en un lado, lo que correspondió a la base foliar a partir de la cual se formó la yema que inició el "diente". Estas observaciones concuerdan con las descripciones de Ayabe y Sumi (1998), quienes encontraron que la

were detailed in the external leaves, likewise its 6 or 7 layers of meristematic parenchymatic tissue corresponding to the mesophyllous (not showed figure).

In figure 2 the anatomic changes that occurred during the process of bulb development are shown. On day 0, sections showed the typical stem anatomic organization, by being watching the apical meristem formed by two regions: one external that corresponds to the tunic and the other one internal, to the *corpus*. The external one is formed by a cells layer that enveloped the *corpus*, was divided of anticlinal way, and the internal layer, by a mass of central portion whose cells were divided of anticlinal and periclinally way (figure 2A). These division patterns gave cyclical changes to the apex during the formation of foliar primordia. Initially, it appeared like a little dome-shaped that was gradually enlarged and after it formed an alternate protuberance in one side, that corresponded to the foliar basement from which the bud that began the "teeth". These observations agree with descriptions of Ayabe and Sumi (Ayabe and Sumi, 1998), who found that internal cellular organization and formation process of the structure in dome-shaped of *in vitro* garlic were similar to those happened *in situ*.

From day 7 the first bulb formation modifications were observed by the thickened on the sheathing leaves basement and the increase on its number. In the primary thickened region the meristematic centers formed a group of little cells, of dense

organización celular interna y los procesos de formación de la estructura en forma de domo del ajo *in vitro*, fueron similares a lo que ocurren *in situ*.

A partir del día 7 se observaron las primeras manifestaciones de bulbificación por el engrosamiento de la base de las hojas envainadoras y el incremento en el número de éstas. En la región de engrosamiento primario fueron visibles los centros meristemáticos que estaban formados por una agrupación de células pequeñas, de citoplasma denso y núcleos difusos fuertemente teñidos, lo cual es indicativo de una alta división celular (figura 2B).

En el día 14, los meristemas responsables del crecimiento de la raíz se individualizaron y la polarización de las divisiones celulares dieron la forma punteada al primordio radical (figura 2C). Paralelamente las hojas envainadoras continuaron su desarrollo hacia la periferia, incrementando el grosor del bulbo. Así mismo, se diferenciaron los haces vasculares colaterales con elementos traqueales (figura 2D).

El desarrollo del bulbo se produjo por organogénesis directa mediante los procesos de inducción y diferenciación de los tejidos. Esto es comparable con lo descrito por Him y Páez (1998) en la formación *in vitro* del rizoma del jengibre (*Zingiber officinale* R.), lo que probablemente puede ser típico de las monocotiledóneas. Las raíces se originaron de manera adventicia, a partir de los centros meristemáticos ubicados en la región de engrosamiento primario, cerca del ápice del tallo. Luego emergieron a un lado de éste y

cytoplasm and diffuse nucleus strongly dyed were visible, that is indicative of a high cellular division (figure 2B). In day 14, meristems responsible of root growing were individualized and polarization of cellular divisions gave the pointed shape to the root primordium (figure 2C). In a parallel way, the sheathing leaves continue its development toward the periphery, by increasing the bulb thick, likewise, the collateral bundle with tracheal elements (figure 2D).

The bulb development was produced by direct organogenesis through the processes of induction and differentiation of tissues. This is comparable to those expressed by Him and Paez (1998) in the *in vitro* formation of ginger rhizome (*Zingiber officinale* R.), that could be probably typical of monocotyledonous. Roots were originated by adventitious way, from meristematic centers located in the primary thickened region, next to the stem apex. After, they emerged by one side of this, and they grow horizontally before of taking curves and continue its growing toward down, like described by Nuevo and Bautista (2001).

Between days 21 and 28 (figure 3), bulb was partially developed and acquired a totally different configuration to the initial one, due to the "teeth" formation, which were formed by an external and dry protector leave, a reserve thickened leave that formed the higher mass and the apical meristem, similar to the first stages of bulb formation of *in situ* garlic, described by Brewster (1994) and Rahin and Fordham (2001).

At 28 days of bulb formation

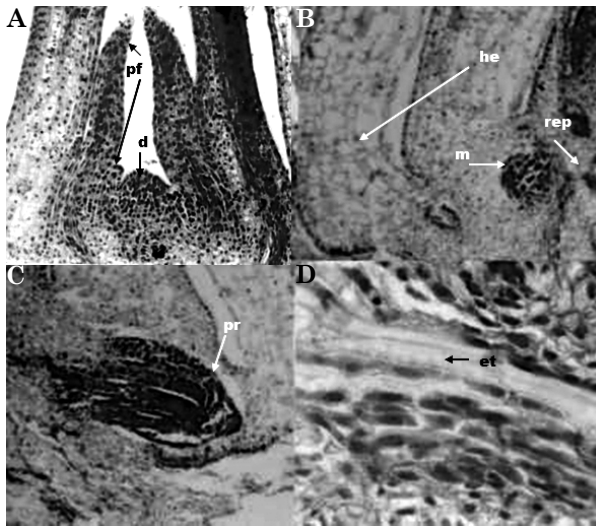


Figura 2. Cambios anatómicos observados durante el desarrollo *in vitro* del bulbo de ajo (*Allium sativum* L.) tipo morado. A: 0 día; B: 7 días; C y D: 14 días; d: domo meristemático; pf: primordios foliares; he: hojas envainadoras; m: meristemo; rep: región de engrosamiento primario; pr: primordio radical, et: elementos traqueales. 400X.

Figure 2. Anatomic changes observed during *in vitro* development of garlic (*Allium sativum* L.) bulb, purple type. A: 0 days; B: 7 days; C and D: 14 days; d: meristematic dome; fp: foliar primordia; sl: sheathing leaves; m: meristem; ptr: primary thickened region; rp: root primordia, te: tracheal elements. 400X.

crecieron horizontalmente antes de tornarse curvas y continuar su crecimiento hacia abajo, tal cual lo describieron Nuevo y Bautista (2001).

Entre los días 21 y 28 (figura 3), el bulbo se encontró parcialmente desarrollado y adquirió una configuración totalmente diferente a la inicial, debido a la formación de los "dientes". Estos estaban constituidos por una hoja protectora externa y seca, una hoja de reserva engrosada que conformaba la mayor masa y el meristemo apical, similar a las primeras etapas

induction, bulbs showed three or four "teeth", formed from the axillary buds thickened located in basement of the sheathing leaves, by partially determining its configuration. From this period, the formation process of new "teeth" and development of those already existents, in such a way that at the end of bulb formation period (60 days), bulbs reached a mean of seven "teeth". These observations differs from described by Camara *et al.*, (1993), when founding that at 30 days the garlic bulbs cv. 'Gigante



Figura 3. Estructura anatómica del bulbo de ajo (*Allium sativum* L.) tipo morado a los 28 días del proceso de bulbificación *in vitro*. 400X. d: "dientes", hp: hoja protectora, hr: hoja de reserva.

Figure 3. Anatomic structure of garlic (*Allium sativum* L.) bulb, purple type at 28 days of *in vitro* bulb process 400X. t: "tooth", pl: protector leave, rl: reserve leaf.

de la formación del bulbo de ajo *in situ*, descritas por Brewster (1994); Rahin y Fordham (2001).

A los 28 días de la inducción a la bulbificación, los bulbos presentaron de tres a cuatro "dientes", formados a partir del engrosamiento de las yemas axilares ubicadas en la base de las hojas envainadoras, determinando parcialmente su configuración. A partir de este período continuó el proceso de formación de nuevos "dientes" y el desarrollo de los ya existentes, de tal manera que al final del periodo de bulbificación (60 días), los bulbos llegaron a alcanzar un promedio de siete "dientes". Estas observaciones difieren de lo descrito por Cámara *et al.*

Roxo' were in harvest stage. This difference could be attributed to a proper answer of cultivar used and to the nutritional conditions of environment and those of cultivation in relation to light and temperature were not the same.

Conclusions

Bulb formation *in vitro* garlic included two development stages: the first one corresponding to the morphogenic state and the second one, to its filled and maturity

The first traces of *in vitro* bulb formation were observed from day 7 being characterized by the thickening

(1993), al encontrar que a los 30 días los bulbos de ajo cv. 'Gigante Roxo' estaban en estado de cosecha. Esta diferencia podría atribuirse a una respuesta propia del cultivar utilizado y al hecho de que las condiciones nutricionales del medio y las de cultivo en cuanto a luz y temperatura, no fueron exactamente las mismas.

Conclusiones

La formación del bulbo de ajo *in vitro* comprendió dos etapas de desarrollo: la primera correspondiente al estado morfogénico y la segunda, al llenado y maduración del mismo.

Los primeros indicios de bulbificación *in vitro* se observaron a partir del día siete, caracterizándose por el engrosamiento de la base de las hojas envainadoras y el cambio en la intensidad de la coloración, a medida que el bulbo fue desarrollándose.

A los 21 días de haberse iniciado el proceso de bulbificación *in vitro* del ajo, se observó la formación de los "dientes" a partir de las yemas ubicadas en las axilas de las hojas envainadoras.

Las raíces adventicias formadas en los bulbos de ajo *in vitro* se originaron a partir de los meristemos ubicados en la región de engrosamiento primario, cerca del ápice del tallo.

Agradecimientos

Los autores expresan el agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT-UCLA) proyecto No. CDCHT-017-AG-2006 por el cofinanciamiento a esta investigación.

of the sheathing leaves basement and change on intensity of collaboration, when bulb was developing.

At 21 days of beginning the process of garlic *in vitro* bulb formation, the "teeth" formation was observed from the buds located in the axil of the sheathing leaves.

The adventitious roots formed in garlic *in vitro* bulb were originated from meristems located in the primary thickened region, next to the stem apex.

Acknowledgements

Authors want to express their thanks to the Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico and Tecnológico (CDCHT-UCLA) project No. CDCHT-017-AG-2006 by the co-financing to this research.

End of english version

Literatura citada

- Ayabe, M. y S. Sumi. 1998. Establishment of a novel culture method, stem-disc culture, and its practical application to micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.). Plant Cell Reports 17:773-779.
- Brewster, J.L. 1994. Onions and other vegetables *Allium*. CAB International. Wellesbourne, U. K.
- Câmara, F., M. Pasqual, J. Ishida y E. Bastos. 1993. *In vitro* bulb formation in garlic (*Allium sativum* L.) cv. Gigante Roxo. Bulbificao *in vitro* de alho (*Allium sativum* L.) cv. Gigante Roso. Revista Ceres 40:566-574.
- Cutter, E.G. 1978. Structure and development of potato plant. p. 70-152. En: Harris, P.M. (Ed.). The

- Potato Crop. Chapman and Hall. London.
- Goleniowski, M., O. Del Longo, S.M. De Forchetti y J.A. Arguello. 2001. Relationships between peroxidases and *in vitro* bulbification in garlic *Allium sativum* L. In *Vitro Cell. and Dev. Biol. Plant* 37(5):683-686.
- Him, de F.Y. y J. Páez de Cásares. 1998. Origen histológico de los órganos regenerados *in vitro* del jengibre (*Zingiber officinale* R.). *Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort.* 42:110-118.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nuevo, P.A. y O. Bautista. 2001. Morpho-anatomical features and posharvest changes in garlic (*Allium sativum* L.). Harvested at different maturities. *Acta Hort.* 555:195-206.
- Rahin, M.A. y R. Fordham. 2001. Environmental manipulation for controlling bulbing in garlic. *Acta Hort.* 555:181-188.
- Ramos de S., G. 1991. El cultivo del ajo en el Estado Mérida. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP). Serie de paquetes tecnológicos. Maracay.
- Torres, J. y N. Mogollón, 1997. Micropropagación clonal masiva de *Cattleya lueddemanniana* Rchb. *Proc. Interamer. Soc. Trop. Hort.* 41:92-98.
- Valverde, R., O. Arias y T. Thorpe. 1992. Estudio histológico en callos de pejibaye (*Guilielma gasipaes*). *Agronomía Costarricense* 16(2): 225-229.
- Wilmink, J., R. Ibrahim y P.C. Debergh. 1995. Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from *in vitro* floral explants of Tulipa (*Tulipa gesneriana* L.). *Scientia Horticulturae* 88:47-57.
- Yeung, E. 1999. The use of histology in the study of plant tissue culture systems some practical comments. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 35:137-143.