

BULBIFICACIÓN *IN VITRO* DEL AJO (*Allium sativum* L.) CON ADICIÓN DE CITOCININAS Y SACAROSA EN EL MEDIO DE CULTIVO

Henry Mujica¹ y Norca Mogollón²

RESUMEN

Se determinó el efecto de la benciladenina (BA), zeatina (Z) y 2-isopentilamina (2-ip) en combinación con sacarosa sobre la bulbificación *in vitro* de ajo tipo morado. El estudio fue desarrollado utilizando vitroplantas que fueron cultivadas en un medio MS suplementado con BA, Z ó 2-ip (0,5; 1,0 y 2,0 mg·L⁻¹) combinadas con tres concentraciones de sacarosa (3%; 6% y 9%). Los cultivos fueron mantenidos a 62 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de luminosidad, bajo un fotoperíodo de 16 horas diarias y 23 \pm 2 °C de temperatura. Todas las citocininas en combinación con sacarosa estimularon el desarrollo de microbulbos. Ocho semanas después de iniciado el experimento, los bulbos alcanzaron una masa promedio de 0,627 g y un diámetro promedio de 10,93 mm, en la dosis de 2,0 mg·L⁻¹ de 2-ip. Además, se alcanzó un incremento en el crecimiento de los bulbos con un aumento en la dosis de sacarosa. Los resultados indican un mejoramiento de la bulbificación de ajo con la adición de citocininas y altas concentraciones de sacarosa al medio de crecimiento.

Palabras clave adicionales: Cultivo de tejidos, benciladenina, zeatina, 2-isopentilamina

ABSTRACT

In vitro bulb formation of garlic (*Allium sativum* L.) by adding cytokinins and sucrose to the growth medium

Individual effect of benciladenine (BA), zeatine (Z), and 2-isopentilamine (2-ip) combined with sucrose over *in vitro* bulb formation of garlic was evaluated. *In vitro* plants were cultured on MS medium supplemented with BA, Z or 2-ip at 0.5, 1.0 and 2.0 mg·L⁻¹. Each of these cytokinins was combined with three concentrations of sucrose (3%; 6% and 9%). Plants were grown under a photon flux density of 62 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a photoperiod of 16 h and temperature of 23 \pm 2 °C. All cytokinins combined with sucrose were appropriated for bulb induction. After eight weeks of culture, microbulbs reached mean mass 0.627 g and diameter 10.93 mm on medium with 2.0 mg·L⁻¹ of 2-ip. Higher bulb growth was obtained with higher sucrose concentrations. Results indicate an improvement of garlic bulb formation by using cytokinins and high sucrose levels in the growth medium.

Additional key words: Tissue culture, benciladenine, zeatine, 2-isopentilamine

INTRODUCCIÓN

El ajo (*Allium sativum* L.) es una planta agámica, por lo que la vía de propagación es mediante bulbillos o "dientes" que se forman en cada ciclo, lo que ocasiona una baja tasa de multiplicación (Fellner et al., 1996). En Venezuela, este tipo de propagación ha traído como consecuencia la diseminación de enfermedades presentes en el material vegetal, lo cual se agrava considerando que no ha habido producción de cultivares resistentes por mejoramiento genético. En tal sentido, la técnica

del cultivo *in vitro* representa una alternativa para el desarrollo de material libre de patógenos. Durante la propagación por esta vía muchas plantas detienen su crecimiento o mueren como resultado de la extrema deshidratación que ocurre cuando las plantas son transferidas desde el laboratorio hacia el invernadero. Los bulbillos de ajo producidos *in vitro* podrían ser más resistentes a la deshidratación que en el caso de las plantas con follaje (Mohamed-Yasseen et al., 1995).

La propagación *in vitro* del ajo se realiza por vitroplantas y microbulbos. Este último

Recibido: Enero 22, 2003

Aceptado: Febrero 28, 2004

¹ Dpto. de Educación Técnica, Programa de Agropecuaria, Universidad Pedagógica Experimental Libertador. Barquisimeto. Venezuela. email: hmujicar@yahoo.com

² Posgrado de Horticultura, Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Apdo. 400, Barquisimeto. Venezuela. email: norkam@ucla.edu.ve

proporciona un medio ideal para producir y conservar material limpio, que puede permitir el inicio de programas de producción de “semillas” certificadas (Pateña et al., 1998). No obstante, el éxito en la bulbificación, depende altamente de la concentración de los reguladores de crecimiento, y de sacarosa, entre otros (Mohamed-Yasseen et al., 1995), lo que implica la transferencia a numerosos medios de cultivo con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento y concentraciones de carbohidratos (Zel et al., 1997). Por eso, en un intento de mejorar la eficiencia en la bulbificación del ajo tipo morado, se estableció como objetivo del presente estudio evaluar el efecto de la benciladenina (BA), zeatina (Z) y 2-isopentilamina (2-ip), en combinación con sacarosa, sobre el desarrollo de bulbos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se establecieron *in vitro* plantas de ajo tipo morado a partir de “dientes” completamente desarrollados, los cuales se cosecharon en la población de Bailadores, estado Mérida, Venezuela.

Propagación *in vitro*

Los bulbos de ajo fueron disgregados en sus “dientes” y almacenados a 10 °C durante 15 días para estimular el proceso de gelación. Después de este período, fueron sometidos a un protocolo de desinfección que incluyó, de manera separada, lavado con Betadine 2% (yodopovidona), inmersión en Kasugamicina 20% y cloro comercial 20%, durante 20 minutos en cada uno, y lavados con agua destilada esterilizada.

Transcurrido este proceso se realizó la extracción del ápice meristemático bajo cámara de flujo laminar. Para ello, los “dientes” se seccionaron transversalmente y se les eliminó las hojas envainadoras hasta visualizar el domo apical, más dos primordios foliares. Este explante (1-2 mm) fue colocado en una solución de cloro comercial al 2% durante 10 minutos. Posteriormente, los explantes o propágulos fueron enjuagados tres veces con agua destilada esterilizada antes de su cultivo en tubos de ensayo contentivos del medio de cultivo.

El medio de cultivo empleado estuvo constituido por las sales minerales de Murashige y Skoog (MS), suplementado con 2-isopentilamina (2-ip) 2,0 mg·L⁻¹, 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 y 30 g·L⁻¹ de sacarosa. El mismo se dispensó en tubos de ensayo (25 x 150 mm) colocando 20 mL/tubo. Estos fueron esterilizados en autoclave por 15 minutos a 121 °C y 1 atmósfera de presión. Los cultivos fueron colocados en un cuarto de crecimiento con aproximadamente 42 mmol·m⁻²·s⁻¹ de luminosidad, fotoperíodo de 16 horas diarias y 23 ± 2 °C. Los brotes se desarrollaron al cabo de cuatro semanas.

Inducción de la bulbificación *in vitro*

A los 30 días de la micropropagación, las vitroplantas con una altura promedio de 12 cm, fueron seccionadas a 2 cm a partir de la base, incluyendo la remoción de raíces. Estos brotes se transfirieron a frascos (250 mL) que contenían 20 mL del medio MS complementado individualmente con benciladenina (BA), zeatina (Z) ó 2-ip, en las dosis de 0,5; 1,0 y 2,0 mg·L⁻¹, cada una de estas citocininas combinadas con tres concentraciones de sacarosa (3 %, 6 % y 9 %). Los medios fueron previamente esterilizados en las mismas condiciones descritas para la micropropagación. Los cultivos se colocaron en cuarto de crecimiento a aproximadamente 62 μmol·m⁻²·s⁻¹ de luminosidad, fotoperíodo de 16 horas diarias y, temperatura de 23 ± 2 °C durante ocho semanas.

Diseño y análisis estadístico

Para cada tratamiento de citocinina se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial regular 3 x 3 (tres dosis de la citocinina combinadas con tres de sacarosa) con ocho réplicas, conformando tres ensayos individuales de 72 unidades experimentales (UE) cada uno, con una vitroplanta por UE, para un total de 216 vitroplantas en todo el experimento. Las variables evaluadas fueron la masa fresca y el diámetro ecuatorial de los microbulbos. Así mismo, se cuantificó el porcentaje de plantas con bulbos. Los resultados fueron procesados por el programa estadístico CoStat 6.0 y se realizaron pruebas de medias de rango múltiple de Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto individual de la benciladenina (BA) en combinación con la sacarosa

Para el efecto de la dosis de BA no se detectaron diferencias significativas para las variables analizadas. Sin embargo, en ambas se observó una leve tendencia en la masa fresca y diámetro del bulbo a medida que se aumentó la dosis del regulador (Cuadro 1).

Cuadro 1. Efecto de la dosis de benciladenina (BA) sobre la bulbificación *in vitro* de ajo (*Allium sativum* L.) tipo morado

Dosis de BA (mg·L ⁻¹)	Masa fresca (g)	Diámetro ecuatorial (mm)
0,5	0,199	6,06
1,0	0,195	6,22
2,0	0,206	6,35
Significancia	ns	ns
C.V. (%)	35	18

ns: No significativo

Con respecto a la dosis de sacarosa se encontraron diferencias altamente significativas para ambas variables. Con el tratamiento de 90 g·L⁻¹ se obtuvieron los mayores valores de masa fresca y de diámetro ecuatorial diferenciados estadísticamente de las dosis de 30 y 60 mg·L⁻¹ (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto de la dosis de sacarosa sobre la bulbificación *in vitro* de ajo (*Allium sativum* L.) tipo morado

Concentración de sacarosa (g·L ⁻¹)	Masa fresca (g)	Diámetro ecuatorial (mm)
30	0,131 b	5,27 b
60	0,169 b	5,80 b
90	0,299 a	7,56 a
Significancia	**	**
C.V. (%)	30	25

** Significativo al 0,1% de probabilidad

Los resultados coinciden parcialmente con los de Kim et al. (1981), quienes demostraron que las yemas florales de jacinto (*Hyacinthus orientalis* L.) cultivadas en un medio con baja concentración de BA (0,1 ó 0,3 mg·L⁻¹) no lograron la diferenciación de bulbos. Los autores concluyeron que una disminución en la concentración de BA o de ANA en el medio ocasionan una reducción significativa

en la formación de órganos de reserva. Además, Steinitz et al. (1991) fallaron en la obtención de microcormos de *Gladiolus grandiflorus* Hort. x *Gladiolus tristis* L cuando los brotes fueron subcultivados en otro deficiente de BA. Sin embargo, cuando los brotes provenían de un medio con alto contenido de BA y se cultivaron en otro con bajo nivel del mismo, observaron la formación de cormos, atribuyendo esta respuesta al efecto residual del BA presente en el medio de iniciación.

Los resultados superaron notoriamente a los de Choi et al. (1992), quienes lograron sólo un 52,3% de bulbificación, utilizando un medio con 10 mg·L⁻¹ de BA. Sin embargo, contradicen lo reportado por Nagakubo et al. (1993) al señalar un aumento en la tasa de bulbificación (número de bulbos/explante) cuando suplementaron el medio con BA. Esta diferencia podría atribuirse a la alta dosis utilizada por estos investigadores (10 mg·L⁻¹), en relación con la mayor dosis empleada en este ensayo (2,0 mg·L⁻¹). De igual manera difieren con Ulrich et al. (1999) al reportar una óptima formación de bulbos de *Crinum* (2,8 g) incorporando 5 mg·L⁻¹ de BA al medio, particularmente cuando las explantas fueron transferidas a otro medio libre de reguladores de crecimiento.

Efecto individual de la zeatina en combinación con la sacarosa

Se detectaron diferencias altamente significativas entre los tratamientos evaluados ya que la dosis de 2,0 mg·L⁻¹ superó a las dosis restantes en las variables de masa fresca y diámetro del bulbo (Cuadro 3).

Así mismo, tanto la masa fresca como el diámetro ecuatorial aumentaron significativamente al aumentar las dosis de sacarosa (Cuadro 4).

Cuadro 3. Efecto de la dosis de zeatina sobre la bulbificación *in vitro* de ajo (*Allium sativum* L.) tipo morado

Dosis de zeatina (mg·L ⁻¹)	Masa fresca (g)	Diámetro ecuatorial (mm)
0,5	0,166 b	5,58 b
1,0	0,160 b	5,47 b
2,0	0,243 a	6,68 a
Significancia	**	**
C.V. (%)	35	14

** Significativo al 0,1% de probabilidad

Cuadro 4. Efecto de la dosis de sacarosa sobre la bulbificación *in vitro* de ajo (*Allium sativum* L.) tipo morado

Concentración de sacarosa (g·L ⁻¹)	Masa fresca (g)	Diámetro ecuatorial (mm)
30	0,102 c	4,64 c
60	0,213 b	6,26 b
90	0,254 a	6,84 a
Significancia	**	**
C.V. (%)	35	25

** Significativo al 0,1% de probabilidad

Estos resultados difieren con los de Steinitz y Yahel (1982), quienes observaron la completa inhibición en la formación de bulbos en *Narcissus tazetta*, cuando el ANA y la zeatina fueron incorporadas al medio de cultivo. No obstante, las concentraciones de ambas 1,0 mg·L⁻¹ y 10 mg·L⁻¹ respectivamente, utilizadas en aquel estudio fueron mucho mayores que las de esta investigación (ANA 0,1 mg·L⁻¹ y zeatina 0,5 - 2,0 mg·L⁻¹). Así mismo, con Wawrosch et al. (2001) al reportar un promedio de 4,6 bulbos/explanta de *Allium wallichii* K. cultivado en un medio MS con 20 µm de zeatina. Este hecho reafirma los reportes controversiales sobre el rol de las citocininas en la formación *in vitro* de órganos de almacenaje.

Efecto individual de la 2-isopentilamina (2-ip) en combinación con la sacarosa

En el efecto de la dosis de 2-ip sólo se detectaron diferencias significativas para la variable diámetro ecuatorial, obteniéndose el mayor valor con el tratamiento de 2,0 mg·L⁻¹ (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto de la dosis de 2-isopentilamina (2-ip) sobre la bulbificación *in vitro* de ajo (*Allium sativum* L.) tipo morado

Dosis de 2-ip (mg·L ⁻¹)	Masa fresca (g)	Diámetro ecuatorial (mm)
0,5	0,610	9,40 b
1,0	0,623	9,72 b
2,0	0,627	10,93 a
Significancia	ns	**
C.V. (%)	35	14

ns: No significativo

** Significativo al 0,1% de probabilidad

En forma similar al caso anterior, la masa fresca y el diámetro del bulbo se incrementaron al aumentar la dosis de sacarosa (Cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto de la dosis de sacarosa sobre la bulbificación *in vitro* de ajo (*Allium sativum* L.) tipo morado.

Concentración de sacarosa (g·L ⁻¹)	Masa fresca (g)	Diámetro ecuatorial (mm)
30	0,311 c	7,52 c
60	0,563 b	10,73 b
90	0,986 a	11,81 a
Significancia	**	**
C.V. (%)	37	14

** Significativo al 0,1% de probabilidad

En este caso los resultados concuerdan con Bhojwani et al. (1982), quienes indujeron un buen tamaño y masa fresca de microbulbos de ajo agregando al medio una combinación de ANA y 2-ip. Adicionalmente, Robert et al. (1998) obtuvieron un 88% de bulbificación en ajo cuando suplementaron el medio con 5 mg·L⁻¹ de 2-ip. Por ello, esta citocinina es considerada como un importante regulador de crecimiento en el cultivo de meristemas, y su efecto estimulador en la formación de órganos de almacenaje, fue demostrado por Zel et al. (1997) para bulbificación en ajo. Por otra parte, el hecho de que con esta citocinina se presentó una pequeña tasa de bulbificación múltiple (2 %), coincide con Barandiaran et al. (1999), quienes observaron un comportamiento similar para los ajos tipo rosa, blanco, chino y morado. Además, estos autores encontraron que con las accesiones del tipo morado lograron un mayor diámetro en comparación con los otros tipos, lo cual confirma la influencia del genotipo en la inducción *in vitro* de bulbos de ajo.

Con todos los reguladores de crecimiento la bulbificación fue del 100%, y sólo en el tratamiento del 2-ip hubo formación de bulbos múltiples presentándose en el 2% de los cultivos de 2 a 3 microbulbos de 2 a 5 mm de diámetro.

A pesar de que el efecto de las tres citocininas sobre el proceso de bulbificación del ajo tipo morado fue diferente, todas influyeron de manera determinante en dicho proceso. No obstante, los mayores valores de masa fresca se registraron con 2-ip, cuyas dosis superaron los de BA y zeatina, teniendo esta última el menor efecto. Esta misma tendencia fue observada para el diámetro del bulbo (Cuadro 7).

En general, la eficiencia en la

microbulbificación de ajo fue dependiente de la concentración de las citocininas en el medio de cultivo. Esta variación puede ser debida al grado de sensibilidad de las células hacia los reguladores de crecimiento, la cual depende de los niveles hormonales en la planta y la influencia del balance entre auxinas y citocininas presentes en el medio que no puede ser evitada. El efecto sinérgico entre las auxinas y las citocininas ha sido demostrado en la formación de bulbos en ajo (Bhojwani et al., 1982; Nagakubo et al., 1993).

Cuadro 7. Efecto de los reguladores de crecimiento sobre la bulbificación *in vitro* de ajo (*Allium sativum* L.) tipo morado

Regulador de crecimiento	Masa fresca (g)	Diámetro ecuatorial (mm)
BA	0,200 b	6,21 b
Zeatina	0,189 b	5,91 b
2-ip	0,620 a	10,01 a

Por otra parte, la microbulbificación fue significativamente afectada por la sacarosa (Cuadros 2, 4 y 6), la cual aumentó con el incremento en la concentración de ésta de 3 a 9%. Estos resultados están de acuerdo con los de Lipavska y Vrengdenhil (1996), quienes reportaron un aumento en la acumulación de masa seca en brotes de papa (*S. tuberosum* L.) por el incremento en la dosis de sacarosa. Esta respuesta fue explicada por el efecto inductor de este carbohidrato a bajas concentraciones, lo que resulta en un potencial menos negativo en el medio, estimulando la división y la elongación celular. Otra posible explicación, es el hecho de que la sacarosa es hidrolizada extra celularmente a glucosa y fructosa, debido a la enzima ácido invertasa asociada con la pared celular, la cual puede ser secretada por el tejido de los microbulbos hacia el medio de cultivo, tal como fue demostrado en bulbificación de *Lilium japonicum* (Yamagishi, 1998).

En este sentido, los resultados se asemejan a los de Nagakubo et al. (1993) quienes indujeron bulbificación de ajo de madurez tardía aumentando la concentración de sacarosa de 6 a 12 %, y a los de Yang et al. (1993) al lograr inducir bulbificación con 9% de sacarosa en el medio MS.

En esta investigación, la masa y el diámetro de los bulbos de ajo producidos con 9% de

sacarosa fue superior estadísticamente que con 6 y 3 %, lo cual coincide con los resultados de Cámara et al. (1993) al reportar un incremento en esas mismas variables para el cv de ajo 'Gigante Roxo', cuando la sacarosa se aumentó de 3 a 6 %; además, se asemejan a los de Keller (1993), al señalar una óptima formación de bulbos en *A. porrum* cuando el medio fue complementado con 3, 5 y 15 % de sacarosa, reafirmando la efectividad de este carbohidrato en la bulbificación del género *Allium*.

CONCLUSIONES

La eficiencia en la microbulbificación de ajo fue dependiente del tipo y de la concentración de las citocininas en el medio de cultivo, observándose que la benciladenina (BA), zeatina y 2-isopentilamina (2-ip) estimularon el desarrollo de los microbulbos en el 100% de los cultivos, y sólo el 2-ip presentó una leve tendencia a bulbificación múltiple.

La mayor masa fresca y diámetro ecuatorial se obtuvieron con la dosis de 2,0 mg. L⁻¹ de 2-ip, alcanzando promedios de 0,627 g y 10,93 mm, respectivamente.

La microbulbificación fue significativamente incrementada por la sacarosa, independientemente de la citocinina utilizada.

LITERATURA CITADA

1. Barandiaran, X., N. Martín, M. Rodríguez, A. Di Pietro y J. Martin. 1999. Genetic variability in callus formation and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Reports* 18: 434-437.
2. Bhojwani, S.A., D. Cohen y P. R. Fry. 1982. Production of virus-free garlic and field performance of micro-propagated plants. *Scientia Hort.* 18: 39-43.
3. Cámara, 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.
4. Choi, S., J. Oh, J. Kim, J. Lim, D. Choi, B.

- Lee y D.U. Choi. 1992. Meristem culture of garlic (*Allium sativum* L.) 1. Effects of growth regulators through *in vitro* multi-propagation of garlic (*Allium sativum* L.). Horticultural Abstracts 63 (10): 960.
5. Fellner, M., W. Kneifel, D. Gregorits y W. Leonhardt. 1996. Identification and antibiotic sensitivity of microbial contaminants from callus cultures of garlic *Allium sativum* L. and *Allium longicuspis* Rgl. Plant Science 113: 193-201.
6. Keller, E. R. 1993. Sucrose, cytokinin and ethylene influence formation of *in vitro* bulblets in onion and Leek. Genet. Res. Crop. Evol. 40 (2): 113-120.
7. Kim, Y. J., P. M. Hasegawa y R. A. Bressan. 1981. *In vitro* propagation of hyacinth. HortScience 16 (5): 645-647.
8. Lipavska, H. y D. Vrengdenhil. 1996. Uptake of manitol from the media by *in vitro* grown plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 45: 103-107.
9. Mohamed-Yasseen, Y., A. Barringer y W.E. Splittstoesser. 1995. *In vitro* bulb production from *Allium spp.* In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 31:51-51.
10. Nagakubo, T., A. Nagasawa y H. Ohkawa. 1993. Micropropagation of garlic through *in vitro* bulbet formation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 32: 175-183.
11. Pateña, L.F., S.M. Rasco-Gaunt, V.P. Chávez, A.L. Bariring y R. Barba. 1998. Seed production and *in vitro* conservation systems for garlic and shallot. Acta Hort. 461: 503-513.
12. Robert, U., J. Zel y M. Ravnikar. 1998. Thermotherapy in virus elimination from garlic: Influences on shoot multiplication from meristems and bulb formation *in vitro*. Scientia Hort. 73(4): 193-202.
13. Steinitz, B. y H. Yahel. 1982. *In vitro* propagation of *Narcissus tazetta*. HortScience 17(3): 333-334.
14. Steinitz, B., A. Cohen, Z. Goldberg y M. Kochba. 1991. Precocious gladiolus corm formation in liquid shake culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 26: 63-70.
15. Ulrich, M., F. T. Davies, Y. C. Koh, S. A. Duray y J. N. Egilla. 1999. Micropropagation of *Crinum* 'Ellen Bosanquet' by tri-scales. Scientia Hort. 82: 95-102.
16. Wawrosch, C., P. R. Malla y B. Kopp. 2001. Micropropagation of *Allium wallichii* Kunth, a threatened medicinal plant of Nepal. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 37 (5): 555-557.
17. Yamagishi, M. 1998. Effects of culture temperature on the enlargement, sugar uptake, starch accumulation, and respiration of *in vitro* bulblets of *Lilium japonicum* Thunb. Scientia Hort. 73: 239-247.
18. Yang, S. G., H. Lee, W. Jeong, S. Min y J. Liu. 1993. Production of virus-free microbulbs of garlic (*Allium sativum* L.) by *in vitro* culture of vegetative and floral buds in immature involucre. J. of the Korean Society for Hortic. Sci. 34 (3): 179-183.
19. Zel, J., N. Debeljak, R. Uzman y M. Ravnikar. 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.