



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

## ANATOMÍA DEL DESARROLLO Y PRODUCCIÓN DE BULBILLOS MEDICINALES DE AJO ELEFANTE (*Allium ampeloprasum* L.)

MARLEN ALONDRA CORTES SANTOS

T E S I S  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO

2022



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: **Anatomía del desarrollo y producción de bulbillos medicinales de ajo elefante (*Allium ampeloprasum* L.)**, realizada por la estudiante: **Marlen Alondra Cortes Santos**, con la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

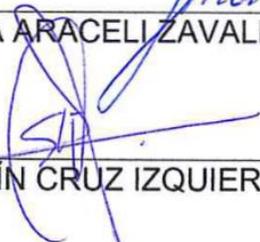
MAESTRA EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
FISIOLOGÍA VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA

  
DRA. HILDA ARACELI ZAVALETA MANCERA

ASESOR

  
DR. SERAFÍN CRUZ IZQUIERDO

ASESOR

  
DR. ÁNGEL VILLEGAS MONTER

Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, septiembre de 2022

# ANATOMÍA DEL DESARROLLO Y PRODUCCIÓN DE BULBILLOS MEDICINALES DE AJO ELEFANTE (*Allium ampeloprasum* L.)

Marlen Alondra Cortes Santos, M.C.  
Colegio de Postgraduados, 2022

## RESUMEN

*Allium ampeloprasum* L., (Amaryllidaceae) conocido como “ajo elefante” se cultiva en Tezcuila de Ocampo, Sierra Norte de Puebla, desde hace 35 años, donde se reconocen dos tipos de plantas: “machos” y “hembras”, con diferencias en la producción de bulbos culinarios (BC) y bulbillos medicinales (BM), estos últimos conocidos como “ajo japonés”. Los BM son muy apreciados en la herbolaria, tienen alta demanda y alto precio en el mercado, pero poco se conoce acerca de su ontogenia y desarrollo. El objetivo de la presente investigación es contribuir al conocimiento de la ontogenia, desarrollo y anatomía de los bulbillos medicinales de *A. ampeloprasum* L., mediante el estudio histológico de su diferenciación, y su asociación con la etapa fenológica. De plantas en cultivo, se identificaron 8 estados fenológicos: 1. siembra de semilla agronómica; 2. Brotación; 3. Plántula; 4. Planta con 4-6 hojas verdes (nomófilos); 5. Maduración de todos los nomófilos; 6. Levantamiento del escapo floral; 7. Floración; 8. Cosecha. El estudio anatómico se realizó con microscopía de luz (ML) y Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). La producción de BM por plantas “macho” y “hembras” así como algunas variables morfológicas (diámetro y peso) fueron evaluadas y analizadas estadísticamente. La presencia de taninos, proteínas, almidón, polisacáridos insolubles, lípidos y lignina fueron evaluados mediante histoquímica. Los bulbillos medicinales iniciaron su diferenciación solo en la Etapa 4 cuando la planta presentó 4-6 hojas (nomófilos) maduras con lígula expuesta: los meristemas de los bulbillos medicinales iniciaron en las axilas de las hojas basales, las yemas aparecen en pares opuestos (decusadas) y en sentido acrópeto (de la base hacia la punta). Las dos hojas más basales y externas del BM se convierten en dos catáfilos oscuros y lignificados que protegen al BM de la desecación dándole una larga vida de anaquel. La ontogenia de los BM sucede primero y la formación de los BC sucede después. El diámetro, largo y peso de los BM producidos por las “plantas hembra” es significativamente mayor que los producidos por las “plantas macho”. No se detectaron taninos ni almidón en el tejido de reserva de los BM y BC.

**Palabras clave:** Amaryllidaceae, *Allium*, ajo japonés, fenología, anatomía.

# ANATOMY OF THE DEVELOPMENT AND PRODUCTION OF MEDICINAL BULBS OF ELEPHANT GARLIC (*Allium ampeloprasum* L.)

Marlen Alondra Cortes Santos, M.C.  
Colegio de Postgraduados, 2022

## ABSTRACT

*Allium ampeloprasum* L., (Amaryllidaceae) known as “elephant garlic” has been cultivated in Tezcuila de Ocampo, Sierra Norte de Puebla, for 35 years, where two types of plants are recognized: “males” and “females”, with differences in the production of culinary bulbs (CB) and medicinal small bulbs (MB), the latter one known as “ajo japonés”. MB is highly prized in herbalism, have high demand and high price in the market, but little is known about its ontogeny and development. The objective of this research is to contribute to the knowledge of ontogeny, development, and anatomy of the medicinal “bulbillos” of *A. ampeloprasum* L., through the histological study of its differentiation, and its association with the phenological stage. From plants in cultivation, the 8 phenological states were identified: 1. agronomic seed sowing; 2. Sprouting; 3. Seedling; 4. Plant with 4-6 green leaves (nomophiles); 5. Maturation of all nomophiles; 6. Lifting of the floral scape; 7. Flowering; 8. Harvest. The anatomical study was performed with light microscopy (ML) and Scanning Electron Microscopy (MEB). The production of BM by “male” and “female” plants and some morphological variables (diameter and weight) were evaluated and statistically analyzed. The presence of tannins, proteins, starch, insoluble polysaccharides, lipids, and lignin was evaluated by histochemistry. The medicinal “bulbillos” began their differentiation only in Stage 4 when the plant presented 4-6 mature leaves (nomophylles), with exposed ligula: the meristems of the medicinal bulbillos began in an axillary position of the basal leaves, the buds appear in opposite pairs (decussate) and in an acropetal direction (from the base to the tip). The two most basal and external leaves of the MB became lignified and brown protecting the bulb from desiccation giving them a long shelf life. The ontogeny of the WBs happens first, and the formation of the BBs happens later. The diameter, length and weight of the BMs produced by “female plants” is larger than the produced by the “male plants”. There were no detected tannins or starch in the storage tissue of the MB and CB.

**Keywords:** Amaryllidaceae, *Allium*, Japanese garlic, phenology, anatomy.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco sobremanera a la Dra. Hilda Zavaleta por su confianza, consejos, apoyo, sobre todo gracias por su amigable y siempre positiva actitud.

A mis asesores por su valioso tiempo prestado y consejo para mejorar este trabajo. Dr. Serafín, gracias por apoyar este proyecto de principio a fin. Dr. Ángel, gracias por sus acertados comentarios, amabilidad y confianza.

A mi sinodal, Dra. María de Lourdes, gracias por su amable ayuda.

Al Colegio de Posgraduados Campus Montecillo y al PREGEP-FIV, por la oportunidad de aprendizaje y desarrollo académico-personal. Gracias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada, misma que ayudo a desarrollar este proyecto y permitirme estudiar una maestría. Gracias.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo está dedicado a mi hija Dulce Alondra y mi esposo Luis, gracias por apoyarme en cada decisión, gracias por todo el amor, cariño, confianza, por alentarme a estudiar un postgrado.

A mi madre Sara, padre y hermanos por su amor, comprensión y apoyo.  
A toda mi familia, amigos y maestros que han contribuido a cumplir esta meta.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	iii
ABSTRACT .....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	v
DEDICATORIA .....	vi
LISTAS DE CUADROS .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
GLOSARIO .....	xv
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b> .....	3
2.1 Objetivos generales .....	3
2.2 Objetivos específicos .....	3
2.3 Hipótesis .....	3
<b>III. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	4
3.1 Clasificación y descripción botánica .....	4
3.2 Distribución geográfica .....	7
3.3 Fisiología y desarrollo .....	9
3.4 Cultivo de <i>A. ampeloprasum</i> L. ....	10
3.5 Aspectos anatómicos de <i>Allium spp.</i> .....	13
3.5 Fitoquímica .....	17
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	20
4.1 Terminología “común” .....	20
4.2 Lugar de cosecha en campo abierto .....	20
4.3 Establecimiento de experimento en Invernadero .....	22
4.4 Definición de fases y etapas fenológicas .....	22

Material biológico.....	24
4.7 Estudio anatómico con Microscopía de Luz (ML) .....	24
4.8 Estudio anatómico con Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	26
4.10 Estudio Histoquímico.....	28
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>31</b>
5.1 Fenología.....	31
5.2 Caracteres agronómicos.....	38
5.3. Anatomía del desarrollo de bulbillos medicinales. ....	41
5.3 Histoquímica.....	62
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>67</b>
<b>VII. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>74</b>

## LISTAS DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Clasificación del tamaño de bulbos de <i>Allium ampeloprasum</i> L. (Wolf, 2004). .....	11
<b>Cuadro 2.</b> Caracteres cualitativos y sus estados en <i>Allium ampeloprasum</i> L. (Khorasani, 2018). .....	16
<b>Cuadro 3.</b> Fenólicos y actividad antioxidante de los extractos metanólicos de <i>Allium ampeloprasum</i> L. (García <i>et al.</i> , 2014) (media $\pm$ DE; n = 3). .....	17
<b>Cuadro 4.</b> Caracterización química y nutricional de la parte comestible de <i>Allium ampeloprasum</i> L. (García <i>et al.</i> , 2014) (media $\pm$ SD, n = 3). .....	18
<b>Cuadro 5.</b> Variables morfológicas, medidas en plantas de <i>Allium ampeloprasum</i> L. ...	35
<b>Cuadro 6.</b> Variables morfológicas, medidas en plantas de <i>Allium ampeloprasum</i> L. Continuación <b>Cuadro 5</b> . .....	36
<b>Cuadro 7.</b> Variables agronómicas del bulbo hembra y macho y sus componentes (dientes y bulbillos medicinales) de <i>Allium ampeloprasum</i> L., en etapa 8: .....	39
<b>Cuadro 8.</b> Comparación de medias, de variables medidas en bulbo hembra, macho y BM de <i>Allium ampeloprasum</i> L., en etapa 8: .....	41

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Esquema de <i>Allium ampeloprasum</i> L. (Royal Botanic Gardens Kew, 2022). .....	6
<b>Figura 2.</b> Morfología de una planta con escapo floral de <i>Allium ampeloprasum</i> var. <i>ampeloprasum</i> (GHG-L): (A) Parte aérea de la planta con inflorescencia joven cubierta por una espata; (B) Planta con un brote de inflorescencia erecto y largo con inflorescencia desprovista de espata; (C) Inflorescencia y una flor antes de la antesis. (D) Inflorescencia y flor durante la antesis; (E), Bulbo subterráneo con bulbillos ubicados en un pedúnculo (flechas). (F) Bulbo desprovisto de cubierta con dientes amarillentos. (G) Sección transversal a través del bulbo con dientes dispuestos radialmente. (H) Dientes. (adaptada de Najda <i>et al.</i> , 2016). .....	7
<b>Figura 3.</b> Distribución mundial de <i>A. ampeloprasum</i> , (Royal Botanic Gardens, Kew, 2022). .....	8
<b>Figura 4.</b> Grupo II de la sección <i>Allium</i> (subsección Scordoprason de F. Hermann, 1939): (A) vista de la superficie de la hoja de <i>Allium ampeloprasum</i> x 150; (B-C) corte transversal de la hoja de <i>Allium rotundum</i> . L = laticiferos (Gregory, 1996, Harding, 2004). .....	13
<b>Figura 5.</b> Anatomía de dientes de <i>Allium sativum</i> L. cv. Yatsauk hmwar phyu: (A) Vista de la superficie del diente que muestra las células epidérmicas y los estomas.; (B) Sistema de tejido en diente, que muestra la epidermis externa y el tejido fundamenta. St; estoma anemocítico, epi; epidermis. (Thet Thet Zin, 2017). .....	15
<b>Figura 6.</b> Micrografía de las células subepidérmicas de la túnica del bulbo más externa en <i>Allium ampeloprasum</i> ; Flechas señalan cristales de oxalato de calcio prismáticos (Khorasani, 2018). .....	15
<b>Figura 7.</b> Corte transversal de raíz de <i>Allium wallichii</i> : (A) Sistema de tejido, mostrando la estela, corteza y epidermis de la raíz; (B) Porción ampliada de la estela. co; corteza; e; epidermis; en; endodermis; mx; metaxylema; p; periciclo; pl; floema, px; protoxilema (Tiwari <i>et al.</i> , 2014). .....	16
<b>Figura 8.</b> Apariencia externa de estructuras bulbosas de <i>Allium ampeloprasum</i> L. ....	20

<b>Figura 9.</b> Ubicación de parcelas de muestreo: (A) Parcela 1: ubicación Latitud 19.8303706 y longitud-97.8075867; (B) Parcela 2, ubicación: Latitud 19.8300468 y longitud -97.798450; (C) Parcela 3, ubicación: Latitud 19.8332438 y longitud -97.8043659. ....	20
<b>Figura 10.</b> Ubicación del municipio de Tetela de Ocampo, Puebla (Municipium, 2021). ....	21
<b>Figura 11.</b> Forma de medir largo y ancho en bulbo hembra, macho, diente y bulbillo medicinal. ....	23
<b>Figura 12.</b> Representación de las fases de <i>Allium ampeloprasum</i> L. ....	32
<b>Figura 13.</b> Etapas fenológicas del cultivo de <i>Allium ampeloprasum</i> L. ....	37
<b>Figura 14.</b> Tipos de bulbos en plantas hembra y machos de <i>Allium ampeloprasum</i> L.: (A) Bulbos de la “planta hembra”; (B) Bulbos de la “plantas macho”; (C) Dientes de bulbos hembra; (D) Bulbillos medicinales. Los bulbos de “plantas macho” no desarrollan dientes, solo están formados por las bases de las hojas ensanchadas como en la cebolla ( <i>Allium cepa</i> L.). ....	40
<b>Figura 15.</b> Etapa 1. Anatomía del bulbo semilla en cortes longitudinales de <i>Allium ampeloprasum</i> L.: (A, B) Estructura interna del meristemo apical del bulbo semilla, corte histológico de parafina teñido con safranina-verde fijo FCF; (C, D) Micrografía de Microscopia Electrónica de Barrido de la zona meristemática. a, axila; c, catáfilo; m, meristemo apical; p, primordio foliar; r, primordio de raíz; rc, catáfilo de reserva; s, tallo. ....	45
<b>Figura 16.</b> Etapa 3. Anatomía en corte mediano de plántula <i>Allium ampeloprasum</i> L.: (A, B) corte de parafina teñido con safranina-verde fijo FCF;(C, D) Micrografía de Microscopía Electrónica de Barrido del corte mediano de la plántula. a, axila; c, catáfilo de reserva (diente de ajo); m, meristemo apical; n, base de nomófilo; p, primordio foliar; r, primordio de raíz; s, tallo. ....	47
<b>Figura 17.</b> Etapa 4. Anatomía del inicio de bulbillos medicinales <i>Allium ampeloprasum</i> L., en etapa 4. La planta con 4-6 hojas verdes (nomófilos). Cortes medianos de parafina teñidos con safranina-verde fijo FCF: (A) Región central del bulbo muestra el inicio de bulbillos	

medicinales; (B) Promeristemo en la axila de una hoja joven. (C) Levantamiento del meristemo del bulbillo. (D) Entrada de procambium al meristemo. (E) Formación de la primera hoja envainada. (F) Inicio de la segunda hoja, y formación de la yema del bulbillo. b, primordio de bulbillo medicinal; m, meristemo apical; n, base de nomófilo; p, primordio foliar; r, primordio de raíz; s, tallo; h, hoja envainada. Flechas indican axilas. .... 49

**Figura 18.** Etapa 4. Desarrollo de bulbillos de *Allium ampeloprasum* L., observado con Microscopía Electrónica de Barrido. (A) Corte mediano del bulbo principal de la planta. (B) Yema del primer bulbillo. (C) Detalle del meristemo y vainas de la yema. am, meristemo apical; bm, meristemo de bulbillo medicinal; lp1: Primordio de la primera hoja envainada; lp2 Primordio de la segunda hoja envainada., lp3, primordio de la tercera hoja envainada; m, meristemo de yema; n, base de nomófilo; s, tallo; sb, tallo del bulbillo..... 50

**Figura 19.** Etapa 4. Estructura de los primordios de bulbillos medicinales *Allium ampeloprasum* L., observada con Microscopía Electrónica de Barrido. (A) Meristemo en la axila de una hoja joven. (B) Formación de la primera hoja envainada (catáfilo). (C) Formación de la segunda hoja envainada (catáfilo), y formación de la yema del bulbillo. (D) Formación de la tercera hoja envainada. a, axila; m, meristemo, b, primordio de bulbillo medicinal; m, meristemo apical; n, base de nomófilo; p, primordio foliar..... 51

**Figura 20.** Etapa 4. Micromorfología externa del desarrollo de bulbillos de *Allium ampeloprasum* L., con MEB. (A, D, G) Meristemo en la axila de una hoja joven. (B, E, H) Levantamiento del meristemo del bulbillo, formación de las primeras hojas envainadas. (C, F, I) Primordio de la segunda hoja envainada. lp1, primordio de la primera hoja envainada; lp2, primordio de la segunda hoja envainada..... 52

**Figura 21.** Etapa 4. Morfología del desarrollo de bulbillos medicinales de *Allium ampeloprasum* L.: (A) Planta completa, (B) Detalle de lígulas expuestas; (C) Base del tallo principal, sin nomófilos, que muestra la aparición espacial de bulbillos, en posición alterna y decusada en sentido

acrópeto, se observa en posición superior, la reciente formación de yemas de dientes culinarios. (D) Crecimiento y tamaño relativo de los bulbillos medicinales. b, bulbillito; cb, yema de diente culinario; l, lígula; lb, lámina de la hoja. s, tallo; sb, tallo del bulbillito..... 53

**Figura 22.** Etapa 5. Morfología en fresco del inicio del llenado de bulbo principal de *Allium ampeloprasum* L.; (A) Planta completa de bulbo hembra y bulbo macho; (B) Detalle de bulbillos medicinales en planta hembra y planta macho; (C) Corte transversal de bulbo hembra que muestra la aparición de los bulbos culinarios (dientes). b, bulbillito medicinal; cb, yema de diente; fb, bulbo hembra; mb, bulbo macho; n, base de nomófilo; nb, lámina del nomófilo; ps, pseudotallo; r, raíz; s, tallo; sp, espata..... 55

**Figura 23.** Etapa 5. Formación de escapo floral de *Allium ampeloprasum* L.; (A) Bulbo sin hojas, que muestra el alargamiento temprano del escapo, en la base el inicio de la formación de los dientes; (B) Primordio de la inflorescencia. (C, D) Primordios florales de la inflorescencia observado con MEB; (E) Etapa temprana del levantamiento de las anteras en un primordio floral. a, primordio de anteras; br, brácteas; cb, yema de diente; fp, primordio floral; fs, escapo floral; i, inflorescencia; sp, espata; t, tépalos..... 57

**Figura 24.** Morfología en fresco del levantamiento del escapo floral (etapa 6). (A) Planta completa de *Allium ampeloprasum* L. (B) Inicio del levantamiento del escapo floral. (C) Desarrollo simultáneo de dientes en bulbo hembra sin hojas. b, bulbillito; c, diente; fs, tallo del escapo floral; l, lígula; lb, lámina de la hoja; r, raíz adventicia; sp, espata..... 59

**Figura 25.** Morfología en fresco de la inflorescencia de *Allium ampeloprasum* L., en etapa 7. (A) Apariencia de la umbela cuando se encontraba dentro de la espata cerrada, en la fotografía la espata fue removida. (B) Apariencia de la umbela expuesta, después de la apertura natural de la espata. (C) Estadios de la flor. (D) Caída de sépalos, post antesis, androceo de la flor (sin tépalos). a, androceo; cf, flor cerrada; pa, post antesis; fs, escapo floral; of, flor abierta en antesis; p, pedicelo; sp, espata; u, umbela..... 60

- Figura 26.** Morfología en fresco y micromorfología de bulbillos medicinales de *Allium ampeloprasum* L., a la cosecha (etapa 8). (B, C, E, F) Microscopía Electrónica de Barrido en cortes medianos. (A) Bulbillo completo. (B, D) Bulbillo en corte longitudinal mediano. (C) Detalle de los catafilos de protección. (E) Detalle de catafilo de reserva. (F) Detalle de meristemo apical y primordios de vainas foliares. c1, primer catafilo de protección; c2, segundo catafilo de protección; c3: Tercer catafilo y único de reserva; s, tallo; m: meristemo apical; lp, primordio de vaina foliar. .... 61
- Figura 27.** Histoquímica en dientes y bulbillos de *Allium ampeloprasum* L. Microscopia fotónica. (A, C, E) Bulbo diente; (B, D, F) Bulbillo medicinal. (A,B) Detección específica de lípidos, tinción Rojo oleoso. (C, D) Detección específica de proteínas, tinción Azul negro de Naftol. (E, F) Detección específica de polisacáridos insolubles, tinción PAS (Ácido periódico-Schiff). .... 64
- Figura 28.** Anatomía de los catáfilos protectores de los bulbos dientes y bulbillos medicinales de *Allium ampeloprasum* L. Tinción de lignina con floroglucinol-HCl: (A) Epidermis externa del catafilo de protección en el bulbo diente; (B) Epidermis externa del catáfilo externo de protección del bulbillo medicinal (C1). C. Catafilo de protección interno (C2) del bulbillo medicinal. C. Detalle de la epidermis de la imagen C. ma, macroesclereidas de la epidermis, es, esclereidas subepidérmicas. .... 66

## GLOSARIO

Los siguientes términos fueron descritos de acuerdo con el Diccionario de Botánica (Font Quer, 1953) y en algunos casos con adecuaciones pertinentes de la autora.

**Bulbillo:** Bulbos de pequeñas dimensiones que nacen en la axila de un catafilo de un bulbo padre.

**Bulbo:** Yema subterránea con los catáfilos o bases foliares convertidos en órganos (de reserva), y la porción axial reducida y, generalmente, disciforme, el llamado platillo del bulbo.

**Catafilo:** Hoja modificada, insertada abajo en el tallo, por ejemplo, la escama en un bulbo.

**Hipsofilo:** Hoja modificada, insertada cerca del órgano floral.

**Hoja:** Término usual con que se designa, en los briófitos, pteridófitos y antófitos, todo órgano lateral que brota del tallo o de las ramas de manera exógena y tiene crecimiento limitado, forma generalmente laminar y estructura dorsiventral.

**Nomofilo:** Hoja normal fotosintética.

**Yema:** Rudimento de un vástago, que se forma habitualmente en las axilas de las hojas y suele estar protegido por una serie de catafilos. Este tipo de yema se llama axilar, para diferenciarla de la yema terminal de vástago, constituida por el punto vegetativo y por las hojas jóvenes más próximas, que, dotadas de rápido crecimiento, se combinan sobre él y lo protegen constantemente.

Los siguientes términos y definiciones usados en la presente tesis tienen como base el término común usado por los productores.

**Bulbo tipo hembra:** tallo + hojas + numerosos dientes

**Bulbo tipo macho:** cabeza + hojas + un diente.

**Cabeza:** Tallo corto + base de hojas + yemas con catafilos engrosados.

**Diente:** Yema con catáfilos engrosados.

## I. INTRODUCCIÓN

El ajo elefante (*Allium ampeloprasum* L.), pertenece a la familia Amaryllidaceae, su apariencia es similar a la del ajo común (*Allium sativum* L.), pero botánica y genéticamente es diferente; se considera una de cuatro variedades de puerro (puerro, kurrat, cebolla perla y ajo elefante) (Loppi *et al.*, 2021).

Botánicamente el ajo elefante en contraste con *A. sativum* L. forma umbelas más grandes, que generalmente forma semillas estériles. El bulbo es grande (hasta 500 g) con dientes de 70 - 80 g c/u (Lanzavechia, 2009; Guenaoui, 2013). Como especie del género *Allium*, el ajo elefante es rico en compuestos azufrados, de propiedades medicinales (antibióticas, antilipídicas, antiasmáticas, antidiabéticas, etc.) (Ascrizzi y Flamini, 2020).

Recientemente el ajo elefante se ha propuesto como sustituto del ajo común en la cocina porque su sabor es similar, pero más suave y digestible, ya que contiene menos compuestos azufrados (alina y alicina) (Kim Sunyoung *et al.*, 2018; Ceccantia *et al.*, 2021).

En México, el cultivo de ajo es importante, con 6,783 ha, producción de 86,688 toneladas y rendimiento de 127, 802 hg/ha. (FAO, 2020). Se cultiva en 21 entidades del país y los principales estados productores son Zacatecas, Guanajuato, Puebla, Baja California y Sonora, estados que aportan el 87.1 por ciento de la producción nacional (SAGARPA, 2017).

El ajo elefante fue introducido a la región de Tetela de Ocampo, Puebla, hace aproximadamente 40 años, donde se le conoce como “ajo italiano” el cual se siembra en temporal en junio con cosechas en marzo, y con riego en octubre, con cosechas en abril, respectivamente. El cultivo y prácticas culturales del *A. ampeloprasum* en México, son poco conocidas y no se han documentado en revistas científicas.

En la región de Telela de Ocampo se reconocen dos tipos de plantas de ajo elefante: 1) “ajos machos”, son plantas que producen bulbos pequeños (3.5 x 3.8 cm) y simples que no emiten escapo floral y 2) “ajos hembras”, son plantas que producen

bulbos grandes (10 x 9 cm) con 6 dientes o más. En la base de estas plantas se producen bulbillos pendunculados pequeños (1.5 x 1 cm) y simples conocidos como “ajo japonés”, los cuales son producidos en mayor número y tamaño por las plantas denominadas “ajos hembra”.

Estos bulbillos (ajo japonés) son muy apreciados en la herbolaria, tienen alta demanda y precio en el mercado. Por lo anterior, la producción de ajo elefante, en Tetela de Ocampo, está enfocada primordialmente a la producción de bulbillos medicinales.

La producción de bulbos hembra es conocida y documentada en otros países (Argentina, Chile e Italia), pero se conoce poco acerca del desarrollo de estos bulbillos medicinales, que son de interés comercial. Se sabe que la aplicación oportuna de prácticas culturales puede favorecer el desarrollo de los productos de interés y obtener mejores cosechas.

Con base en lo anterior la presente investigación tiene como objetivo contribuir al conocimiento del desarrollo de bulbillos medicinales de *A. ampeloprasum* L., mediante el estudio histológico del inicio de su diferenciación y asociación de esta con las etapas fenológicas de la planta, de manera que el productor pueda identificar visualmente el momento de la diferenciación y aplicar el manejo al cultivo para optimizar la producción.

## II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 2.1 Objetivos generales.

1. Estudiar el desarrollo y anatomía de los bulbillos culinarios y medicinales durante la formación y asociarlo a la etapa fenológica del cultivo.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Identificar y caracterizar el inicio de la diferenciación y desarrollo de los primeros bulbillos medicinales y asociarlos a la etapa fenológica del cultivo.
2. Caracterizar la secuencia espacial de la aparición de bulbillos medicinales en el bulbo de la planta madre.
3. Caracterizar variables morfológicas de los tipos de bulbos de *A. ampeloprasum* L.

### 2.3 Hipótesis

1. El inicio de la diferenciación de los bulbillos medicinales se da en las axilas de los catáfilos, las cuales morfológicamente son las bases de hojas modificadas con reservas que forman la mayor parte del bulbo.
2. La aparición espacial de bulbillos ocurre de la base hacia la punta.
3. El crecimiento de bulbillos está influenciado por prácticas realizadas durante el cultivo, como son: fertilización, eliminación del escapo floral, control de plagas y enfermedades.

### III. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 Clasificación y descripción botánica.

*Allium ampeloprasum* L. es el nombre científico asignado y publicado en las bases de datos The Plant List e International Plant Name Index. El registro deriva de World Checklist of Selected Plant Families (WCSP) (datos proporcionados el 23 de marzo de 2012) que lo informa como nombre aceptado (registro 294972) con detalles de publicación originales: Sp. pl. 294 1753 (The Plant List, 2013).

Clasificación de acuerdo a Trópicos (2022) y World Flora Online (WFO, 2022)

Clase: Equisetopsida C. Agardh

Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.

Super orden: Liliales Takht.

Orden: Asparagales Link

Familia: Amaryllidaceae J. St.-Hil.

Género: *Allium* L.

Especie: *Allium ampeloprasum* L.

#### *Familia Amaryllidaceae*

Plantas bulbosas, en su mayoría, perennes, terrestres, ocasionalmente acuáticas o epífitas, ricas en alcaloides específicos de la familia. Bulbos tunicados. Hojas anuales o persistentes, sésiles y lineares, o pecioladas y lanceoladas a ampliamente elípticas, dísticas o dispuestas en espiral. Inflorescencia escaposa, escapo a veces totalmente subterráneo y de apariencia obsoleta, terminado por 2 o más brácteas espatáceas, obvolutas o equitantes, generalmente marcescentes que encierran las flores en capullo; bractéolas internas generalmente presentes y sucesivamente más cortas y estrechas. Flores; muchas, perfectas, frecuentemente grandes y llamativas, sésiles o pediceladas,

cada una generalmente subtendida por una bractéola, actinomorfa o zigomorfa, generalmente protándrica.

Estambres 3 + 3, rara vez 5 o 18 o más, de longitud inferior o variable, insertados en la garganta del perigono o debajo, los filamentos a veces connados de manera diversa o agregados de otro modo, rara vez adnatos al estilo; anteras generalmente dorsifijas, raramente centrífugas o basifijas, introrsas, dehiscentes longitudinalmente o rara vez desde un poro terminal. Estilo filiforme, hueco, ocasionalmente estromoso, rara vez tripartito; estigma capitado, trilobulado o profundamente trifido, generalmente papilado.

Ovario sincárpico, tricarpelado, inferior, tri-ocular (raramente uni), con nectarios septales; óvulos axilares o basales en placentación, anátropos, crasinucelados, bi- o uni-tegmicos. Semillas globosas o subglobosas y carnosas o duras, o aplanadas y aladas, generalmente con testa fitomelánica negra o parda, a veces con un eleosoma caruncular en el extremo chalazal; endospermo con hemicelulosa y lípidos, en los géneros más derivados ricos en agua y/o almidón.

Familia principalmente tropical ampliamente distribuida de 59 géneros y alrededor de 850 especies con centros de diversidad en América del Sur y África del Sur, particularmente en la región andina y en el Mediterráneo (Meerow y Snijman, 1998).

#### *Género Allium L.*

Género grande, probablemente de más de 500 especies, son plantas perennes, en su mayoría bulbosas. Los bulbos están protegidos por pieles membranosas, fibrosas o coriáceas que cubren las escamas engrosadas del bulbo. Las hojas dispuestas en la base, planas o fistulosas frecuentemente envuelven el escapo floral y por lo tanto parecen caulinares. Ocasionalmente, hay constricciones similares a pecíolos entre la lámina y la vaina.

Brácteas hialinas, a menudo fusionadas en un involucro, subtienden las inflorescencias en forma de umbela. Las flores hipóginas, actinomorfas, con pedicelos, son trímeras. Los tépalos se presentan en dos verticilos ligeramente diferenciados. Son libres, en su mayoría de color blanco o rosa a violeta, rara vez azules o amarillos. Los estambres también se presentan en dos verticilos, que con frecuencia son diferentes, los

internos a menudo están dentados. El pistilo trilobular, con un solo estilo y capitado, o más raramente, estigmas trilobulados, a menudo lleva nectarios septales en el ovario. Tiene dos o más óvulos curvos (campilotropos) por lóculo. Se desarrolla en una cápsula loculicida que dehiscente a lo largo de la nervadura central de los carpelos.

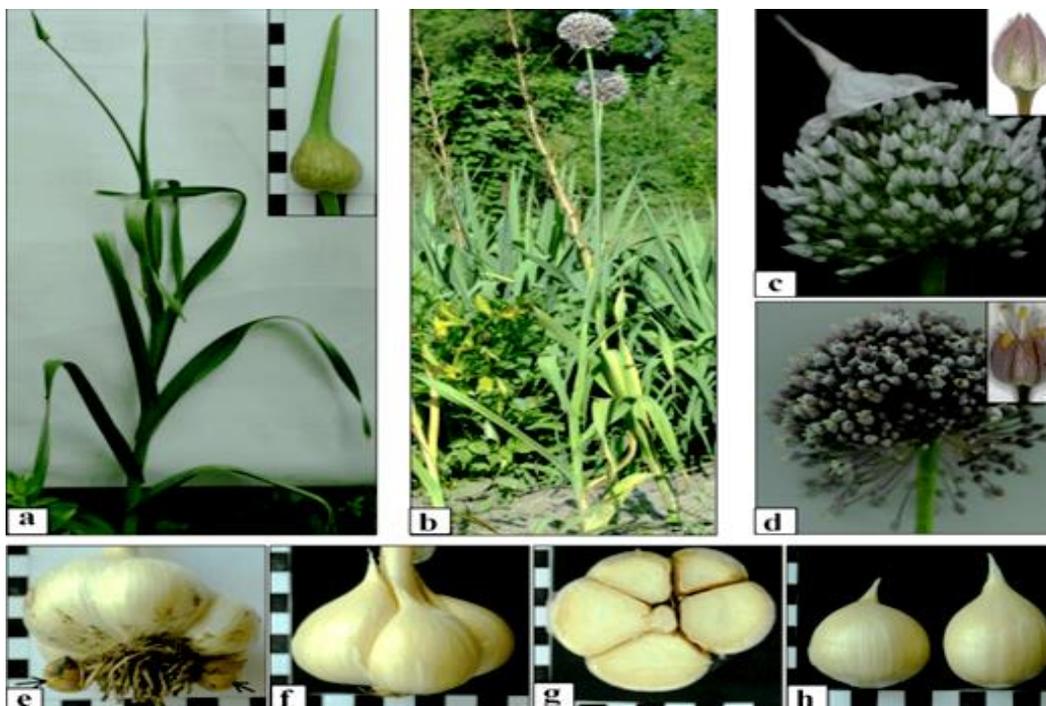
Las semillas angulosas o globulares están recubiertas por una gruesa corteza negra de fitomelano. Las plantas deben su olor característico a los compuestos de azufre (sulfuros allyl) (Rabinowitch y Brewster, 1990).

### *Allium ampeloprasum* L.

Bulbos redondeados-ovoides; tallo robusto, 5–10 dm, con pocas hojas en la mitad inferior; hojas lineares, 5–20 mm de ancho, con quilla aguda; umbela globosa, con muchas flores; sin bulbillos; pedicelos 2–3 cm; punta lavanda a rojo-púrpura, lanceoladas, agudas, de 5 mm, estambres internos con filamentos anchos y planos, que terminan en 2 apéndices similares a pelos que sobresalen de la antera,  $2n = 16$  a 80. Nativa de Europa, Jardín Botánico de Nueva York (Fig. 1, 2) (WFO, 2022).



**Figura 1** Esquema de *Allium ampeloprasum* L. (Royal Botanic Gardens Kew, 2022).



**Figura 2.** Morfología de una planta con escapo floral de *Allium ampeloprasum* var. *ampeloprasum* (GHG-L): (A) Parte aérea de la planta con inflorescencia joven cubierta por una espata; (B) Planta con un brote de inflorescencia erecto y largo con inflorescencia desprovista de espata; (C) Inflorescencia y una flor antes de la antesis. (D) Inflorescencia y flor durante la antesis; (E), Bulbo subterráneo con bulbillos ubicados en un pedúnculo (flechas). (F) Bulbo desprovisto de cubierta con dientes amarillentos. (G) Sección transversal a través del bulbo con dientes dispuestos radialmente. (H) Dientes. (adaptada de Najda *et al.*, 2016).

### 3.2 Distribución geográfica.

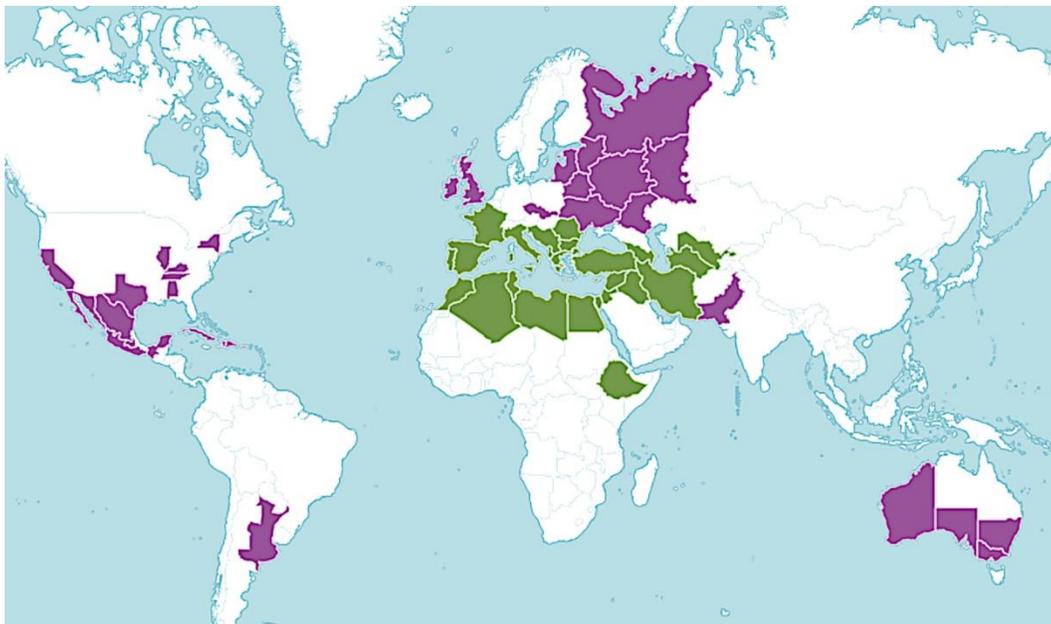
El principal origen geográfico de *A. ampeloprasum*, es la región mediterránea (Guenauoui *et al.*, 2012).

#### *Nativo*

De: Albania, Argelia, Baleares, Bulgaria, Chipre, Islas del Egeo Oriental, Egipto, Etiopía, Francia, Grecia, Irán, Irak, Italia, Kriti, Líbano-Siria, Libia, Marruecos, Palestina, Portugal, Rumania, Cerdeña, Sicilia, Sinaí, España, Transcaucasus, Túnez, Turquía, Turquía en Europa, Turkmenistán, Uzbekistán, Yugoslavia.

### Introducido

En: Alabama, Noreste de Argentina, Azores, Estados Bálticos, Bielorrusia, California, Islas Canarias, Rus de Europa Central, Cuba, Checoslovaquia, República Dominicana, Rusia de Europa del Este, Galápagos, Gran Bretaña, Haití, Illinois, Irlanda, Kentucky, Madeira, Centro, Noroeste, Sureste y Suroeste de México, Nueva Gales del Sur, Nueva York, Russi del Norte y Noroeste de Europa, R, Pakistán, Puerto Rico, Australia Meridional, Russi del Sur de Europa, Tennessee, Texas, Ucrania, Victoria, Australia Occidental, Nueva Gales del Sur, Australia del Sur (Fig. 3) (Royal Botanic Gardens Kew, 2022).



■ Introducido

■ Nativo

**Figura 3.** Distribución mundial de *A. ampeloprasum*, (Royal Botanic Gardens, Kew, 2022).

### 3.3 Fisiología y desarrollo.

#### *Dormancia*

El ajo elefante, es una planta que requiere de un periodo de frío para que concluya el proceso de dormancia, la cual se define como el estado fisiológico que implica actividad metabólica reducida (incapacidad para germinar) en respuesta a diferentes estímulos, que incluyen baja temperatura, alta temperatura, falta de agua o alimento (Withersm y Cooper, 2019; De la Cuadra, 2022). La duración es variable, según la variedad o tipo de ajo, las condiciones ambientales, temperatura de almacenamiento, tamaño del diente, y posición en el bulbo, dientes externos y de mayor tamaño, la superan más rápidamente que los internos y más pequeños (Illanes, 1992; Wolf, 2004).

La dormancia incluye tres periodos; el primero se caracteriza por una inactividad casi completa, independientemente de las condiciones ambientales, durante la cual una señal endógena impide la brotación de las yemas. Sin embargo, los meristemas internos pasan por un proceso continuo de desarrollo lento y el bulbo entra en el segundo período, durante el cual la yema interna en cada diente del bulbo es capaz de crecer y el proceso de brotación se intensifica cuando las condiciones externas lo permiten. Por último, se presenta una respuesta de crecimiento reducida inducida por una señal interna que se transporta a un tejido objetivo dentro de la planta individual, como lo ejemplifica la dominancia apical (Rohkin *et al.*, 2015).

#### *Brotación*

Es el resultado eventual de la liberación de latencia, puede demorar hasta 2 meses. La salida del estado de latencia está caracterizada fundamentalmente por una importante actividad de giberelinas libres y disminución de los hidratos de carbono en los catáfilos, transportándolos hacia la yema y permitiendo la expansión de esta (Mann *et al.*, 1956; Burba, 1991; Wolf 2004).

Aparece en esta etapa división continua y agrandamiento celular que provoca la expansión de la yema, la diferenciación de los primordios foliares y crecimiento activo de

las raicillas preformadas, presentes en la porción próxima del diente semilla (Mann *et al.*, 1956; Burba, 1991; Wolf, 2004).

### *Crecimiento*

Esta etapa se extiende desde la brotación hasta el inicio de la formación de bulbos (en que ocurre el cese de crecimiento de las hojas) requiere temperaturas medias nocturnas inferiores a 16 °C (entre 8 y 20°C) y medias mensuales entre 13 y 24°C para que haya crecimiento vigoroso. Conociendo que el tamaño de bulbos será directamente proporcional al tamaño de la planta en el momento de la inducción del llenado de bulbos, todos aquellos factores que promuevan crecimiento vigoroso serán directamente responsables del incremento de rendimiento, y este será tanto mayor cuanto más prolongada sea la fase vegetativa (Burba, 1991, Wolf, 2004).

### *Bulberización*

El término “bulberización” se refiere al proceso de activación de la planta de ajo para que se inicie la génesis del bulbo. Este proceso lleva consigo la hipertrofia de las yemas axilares de las hojas y la degeneración de los catáfilos basales para formar las túnicas de protección. La planta de ajo, para diferenciar las yemas axilares en dientes y formar el bulbo necesita soportar cierta cantidad de horas frío. En general se considera que el intervalo entre 5 y 10°C es el óptimo para generar plantas capaces de desarrollar bulbos. El periodo de tiempo necesario para que el proceso tenga éxito depende fundamentalmente de la variedad y puede durar entre uno y varios meses (Messiaen, 1975; García, 1998).

## **3.4 Cultivo de *A. ampeloprasum* L.**

### *Épocas de siembra*

Es una hortaliza de siembra directa, una vez cumplido el período de (4 a 5 meses, enero-junio), según las condiciones de temperatura reinante, esto determina que las siembras tempranas de otoño (marzo a mayo) no siempre favorecen una pronta emergencia. Su ciclo requiere entre 210 a 230 días (Pertierra *et al.*, 2020).

### Requerimientos edafoclimáticos

El cultivo prefiere suelos francos a franco-arcillosos, con pH de 5.6 a 8.0, la conductividad eléctrica debe ser inferior a 2.2 dS/m. Temperaturas, mínima (7°C), máxima (30°C) y óptima entre 15 y 20°C. El clima expresado como fotoperiodo largo (más de 13 a 14 horas de luz por día), asociado a época del año y latitud de la zona productora y como temperatura (acumulación de grados frío) determinan el inicio de la bulberización en primavera. Se ha determinado que la proporción de cebollones (bulbo compacto, sin bulbillos) a cosecha está influenciada por siembras tardías y semilla de calibre pequeño (<20 g) (Pertierra *et al.*, 2020).

**Cuadro 1.** Clasificación del tamaño de bulbos de *Allium ampeloprasum* L. (Wolf, 2004).

Categoría de bulbo	Peso de bulbo
Grande	<35 g
Mediano	20-35 g
Pequeño	>20 g

### Prácticas culturales de *A. ampeloprasum* L.

*Desinfección de semillas:* Para el control de posibles problemas por hongos se puede emplear control químico preventivo con carboxamida, carboxim o ditiocarbamato. Una manera fácil de realizar la desinfección consiste en utilizar un tambor de 200 litros agregarle agua hasta la mitad y disolver allí los fungicidas recomendados. Los dientes de ajo se colocan en una malla y se sumergen en la solución por 15 min (Bruna, 2001).

*Sistema de plantación:* En Tetela de Ocampo, Pue., se trabaja con 6 plantas por metro lineal y 40 cm entre hilera, para tener densidad de 166,665 plantas/ha. El rendimiento promedio en estas condiciones supera las 20t/ha (comunicación personal, Adolfo Ibarra Posadas, productor de ajo elefante).

*Riego:* La frecuencia de riego debe establecerse en función de la capacidad de almacenaje de suelo y demanda hídrica diaria, se necesita suelos que estén cerca de capacidad de campo particularmente durante el periodo de crecimiento (Lanzavechia, 20017).

*Emisión de escapo floral:* La eliminación de este, se deberá realizar a medida que esto se vaya produciendo, mediante corte con tijera o con la mano por debajo de la espata, esta práctica es necesaria porque el desarrollo del escapo floral compite internamente en la planta, con el llenado de bulbo, comprometiendo el rendimiento final (Lanzavechia, 20017).

*Cosecha:* Un buen indicador de que el bulbillo ha alcanzado la madurez hortícola, es cuando las hojas envejecen y es cuando las hojas envejecen y cambian de color verde a color amarillo y empiezan a necrosarse. Para determinar el punto de cosecha se puede tener en cuenta el tamaño de bulbo (presencia de tres a cinco hojas envolventes). Habitualmente la cosecha oportuna debe realizarse con una cuchilla laminar que corta las raíces y facilita el arrancado (Lanzavechia, 2017).

#### *Plagas y enfermedades del cultivo Allium spp.*

El ajo es afectado por varias enfermedades principalmente causadas por hongos, las que pueden ocasionar daños de consideración, especialmente durante la brotación de las plántulas, disminuyendo posteriormente el rendimiento y calidad de los bulbos. Entre las enfermedades que se transmiten por el bulbillo semilla (diente) se encuentran el moho azul causada por *Penicillium hirsutum*, Dierckx (*Penicillium corymbiferum*, Westling), pudrición basal (*Fusarium oxysporum* f.sp) cepae (Hans) Snyder y Hansen y cabeza negra (*Embellisia allii* (Campanile) Simons (sin. *Helminthosporium allii* Campanile), mientras otras sobreviven varios años en el suelo y afectan a los bulbillos inmediatamente después de la plantación, ellos son la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk) y pudrición del cuello (*Botrytis allii* Munn) (Sepúlveda *et al.*, 2010)

Entre los nematodos parásitos presentes en el suelo que atacan el cultivo de ajo, se encuentra *Ditylenchus dipsaci*, el cual se cataloga como un endoparásito migratorio, que puede encontrarse en tallo y bulbos, que ha demostrado la mayor incidencia en el deterioro de la calidad y productividad (Guíñes, 2010).

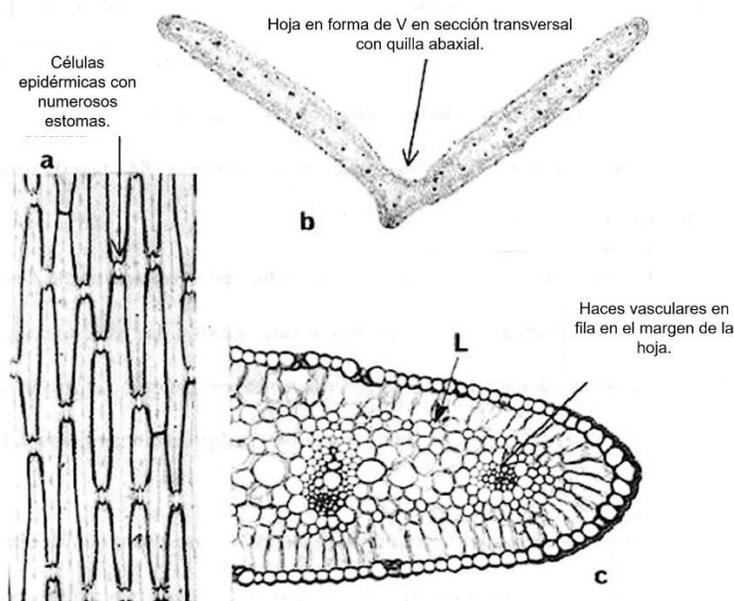
Los insectos y ácaros no constituyen los principales problemas fitosanitarios que afectan al cultivo de ajo, debido a que se trata de un cultivo de invierno, el número de plagas que se desarrollan en estas condiciones no es significativo. Es conocido el efecto

repelente de los extractos de ajo sobre algunas plagas, y a nivel mundial son utilizados en el manejo orgánico de algunas de estas plagas. Del grupo de insectos y ácaros que se encuentran asociados al cultivo, las especies más relevantes son los trips, como son: trips de la cebolla, (*Thrips tabaci* Lindeman) y occidental de las flores (*Frankliniella occidentalis* Pergande), y dentro de los ácaros: *Eriophyes tulipae* Keifer, el eriófido de los bulbos, afecta a los ajos en el campo y en almacenajes (Larraín, 2010).

### 3.5 Aspectos anatómicos de *Allium* spp.

#### Hoja

Gregory (1996) colocó *Allium ampeloprasum* spp. en el Grupo II de la sección *Allium* (subsección Scordoprason de F. Hermann, 1939). La autora describe las hojas casi planas, poco profundas o claramente en forma de V en sección transversal, a menudo con quilla abaxial. Haces vasculares en dos filas. Fila abaxial de haces grandes y pequeños con el xilema frente a la superficie adaxial, fila adaxial de pequeños haces orientados inversamente (Figura 4).



**Figura 4.** Grupo II de la sección *Allium* (subsección Scordoprason de F. Hermann, 1939): (A) vista de la superficie de la hoja de *Allium ampeloprasum* x 150; (B-C) corte transversal de la hoja de *Allium rotundum*. L = laticiferos (Gregory, 1996, Harding, 2004)

Otras características de este grupo son:

- Hoja pseudo-dorsiventral.
- Pelos (cuando están presentes) cortos unicelulares simples.
- Cutícula con una estría longitudinal central.
- Células epidérmicas en archivos regulares alargados longitudinalmente.
- Estomas numerosos y sin células subsidiarias morfológicamente diferenciadas (anomocíticos), en la mayoría de las hileras de células excepto sobre las costillas.
- Las células epidérmicas y los estomas pueden ser similares en ambas superficies (abaxial y adaxial) o las células epidérmicas abaxiales son ligeramente más pequeñas.
- Estoma igualmente numerosos en ambas superficies, hundidos.
- Las paredes exteriores más la cutícula suelen ser moderadamente gruesas.
- Paredes internas delgadas a ligeramente engrosadas, paredes radiales delgadas.
- Tejido en empalizada en una capa adaxial y abaxial (excepto a veces sobre la nervadura central (Gregory, 1996, Harding, 2004)).

### *Bulbo diente*

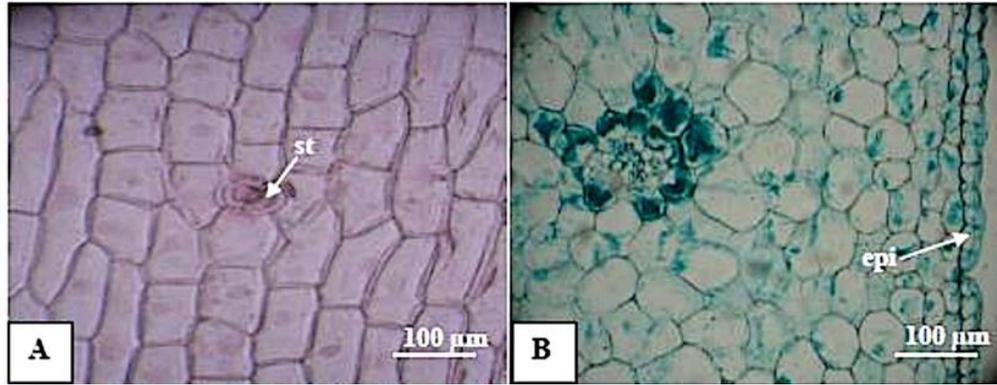
En el estudio de Thet Thet Zin (2017) se describe:

Sistema de tejido dérmico: compuesto por dos tipos de células: células epidérmicas y células guarda de las estomas sin células acompañantes, las células epidérmicas superiores de ambas superficies son similares en forma, células parenquimatosas. Estoma presente, tipo anomocítico, de forma ovalada; células guarda (oclusivas) reniformes.

Sistema de tejido fundamental: De 7 a 17 capas de 312 a 432  $\mu\text{m}$  de espesor, células parenquimatosas, las células de 24.0 a 134.4  $\mu\text{m}$  de largo y de 9.6 a 14.4  $\mu\text{m}$  de ancho.

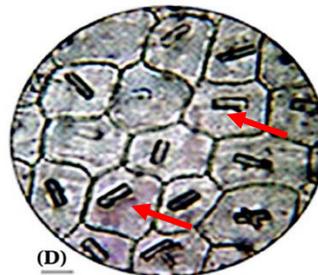
Sistema de tejido vascular: Haz vascular tipo colateral cerrado, forma ovalada, floema compuesto de tubos cribosos, células acompañantes, fibras de floema y parénquima del floema; xilema compuesto de elementos, traqueidas, fibras de xilema y

parénquima xilemático. Elementos de vasos de paredes gruesas, paredes laterales rectas, paredes finales oblicuas o transversales, engrosamientos elicoidales, placas de perforación simples lumen estrecho, fibras laterales rectas, paredes finales agudas. Cristales de oxalato de calcio en forma de varilla presentes (Fig. 5).



**Figura 5.** Anatomía de dientes de *Allium sativum* L. cv. Yatsauk hmwar phyu: (A) Vista de la superficie del diente que muestra las células epidérmicas y los estomas.; (B) Sistema de tejido en diente, que muestra la epidermis externa y el tejido fundamenta. St; estoma anemocítico, epi; epidermis. (Thet Thet Zin, 2017).

Khorasani (2018), analizó la anatomía y morfología de las túnicas del bulbo en el género *Allium*. Los resultados indicaron que los siguientes caracteres son más informativos a nivel seccional y subgenérico (Cuadro 2): cristales de oxalato de calcio en las células subepidérmicas de la túnica (escama) más externa del bulbo, el tipo de traqueidas y la presencia de bulbillos (Fig.6).



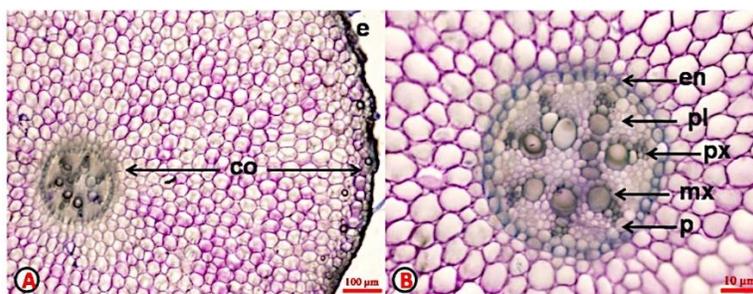
**Figura 6.** Micrografía de las células subepidérmicas de la túnica del bulbo más externa en *Allium ampeloprasum*; Flechas señalan cristales de oxalato de calcio prismáticos (Khorasani, 2018).

**Cuadro 2.** Caracteres cualitativos y sus estados en *Allium ampeloprasum* L. (Khorasani, 2018).

<i>Allium ampeloprasum</i> L	
Caracteres	Estados
Forma de bulbo	Ovalado-globoso
Tipo de bulbo	Agregativo
Bulbillos	Presente
Textura de la túnica	Liso
Color de la túnica	Blanco-grisáceo
Alineación de células subepidérmicas (forma y tamaño)	Regular
Tipo de célula subepidérmica	Parénquima
Forma de célula subepidérmica	Hexagonal
Tipo de pared anticlinal	Recto
Tipo de cristal de oxalatos de calcio	Prismático
Número de cristales (por área):	Numerosos
Distribución de cristal	solitario-agregativo
Tipo de traqueida	Espiral
Almidón	Ausente
Laticífero	Ausente
Rizoma	Ausente

### Raíz

Tiwari *et al.*, (2014) describen la anatomía de raíz en *Allium wallichii*, como sigue: Raíz con una capa epidérmica y amplia región de la corteza que consta de 19-25 capas de capas de células parenquimatosas. La capa cortical más interna es la endodermis, cuyas células están engrosadas con lignina. Hay una estela en el centro, cuya capa más externa es el periciclo. Hay 5-9 grupos de xilema radiante que se alternan con un número igual de grupos de floema. El protoxilema es exarco (apuntando hacia la periferia). No hay médula (Fig. 7).



**Figura 7.** Corte transversal de raíz de *Allium wallichii*: (A) Sistema de tejido, mostrando la estela, corteza y epidermis de la raíz; (B) Porción ampliada de la estela. co; corteza;

e; epidermis; en; endodermis; mx; metaxylema; p; periciclo; pl; floema, px; protoxilema (Tiwari *et al*, 2014).

### 3.5 Fitoquímica

Las especies silvestres de *Allium* con larga tradición de uso, como *A. ampeloprasum*, pueden considerarse fuente de fibra dietética con 4.23% como valor medio (Cuadro 4), ya que una ración de 100 g puede aportar 11.21% de la cantidad diaria necesaria para los hombres y 20.29% para las mujeres, según las recomendaciones de la Food Nutrition Board (Trumbo *et al.*, 2002).

*A. ampeloprasum*, es alimento de bajo valor energético, y buena fuente de fibra y zinc en comparación con sus parientes cultivados y otras hortalizas convencionales. Sus partes comestibles presentan alto porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados, siendo el ácido láctico (AL) el principal ácido graso (53% del total de ácidos grasos) (García *et al.*, 2014).

Muchos de los compuestos que se encuentran en el ajo elefante pueden tener actividad antioxidante, pudiendo quelar metales o deslocalizar la carga electrónica proveniente de los radicales libres (Seabra *et al.*, 2006; García *et al.*, 2014).

**Cuadro 3.** Fenólicos y actividad antioxidante de los extractos metanólicos de *Allium ampeloprasum* L. (García *et al.*, 2014) (media  $\pm$  DE; n = 3).

<b>Fenólicos</b>	
Fenoles totales (mg GAE/g extracto)	5.70 $\pm$ 0.62
Flavonoides totales (mg CE/g extracto)	0.86 $\pm$ 0.05
<b>Actividad antioxidante (EC50 valores, mg/mL extracto metanólico)*</b>	
DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)	15.12 $\pm$ 1.21 <sup>d</sup>
Poder reductor	0.70 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>
Inhibición del blanqueo de $\beta$ -caroteno	1.66 $\pm$ 0.24 <sup>c</sup>
Ensayo de sustancias reactiva (TBARS)	0.11 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>

GAE: equivalentes de ácido gálico; CE: equivalentes de catequina; TBARS: ácido tiobarbitúrico.

**Cuadro 4.** Caracterización química y nutricional de la parte comestible de *Allium ampeloprasum* L. (García *et al.*, 2014) (media  $\pm$  SD, n = 3).

<b>Composición próxima</b>	<b>Muestra 1</b>	<b>Muestra 2</b>	<b>Muestra 3</b>	<b>Muestra 4</b>	<b>Promedio global</b>
pH	6.09 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	5.43 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	5.91 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	5.61 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	5.76
Acidez valorable (mL NaOH/100 g fw)	10.04 $\pm$ 1.12 <sup>a</sup>	13.22 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	16.87 $\pm$ 2.23 <sup>b</sup>	17.27 $\pm$ 2.27 <sup>b</sup>	14.35
Humedad (%)	81.50 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	76.02 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	78.10 $\pm$ 0.19 <sup>c</sup>	77.68 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	78.32
Carbohidratos totales disponibles (%)	12.04 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	20.92 $\pm$ 0.27 <sup>c</sup>	16.76 $\pm$ 1.40 <sup>b</sup>	16.63 $\pm$ 0.93 <sup>b</sup>	16.60
Proteínas (%)	1.20 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	2.02 $\pm$ 0.44 <sup>a</sup>	1.77 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	1.64 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	1.67
Lípidos (%)	0.23 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.12 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.14 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.21 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.18
Fibra (%)	3.56 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	4.72 $\pm$ 0.43 <sup>c</sup>	4.08 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	4.53 $\pm$ 0.14 <sup>c</sup>	4.23
Energía (kcal/100 g)	59.40 $\pm$ 3.02 <sup>a</sup>	97.87 $\pm$ 1.89 <sup>c</sup>	80.03 $\pm$ 6.06 <sup>b</sup>	77.08 $\pm$ 3.06 <sup>b</sup>	78.92
Ceniza (%)	0.97 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>	0.48 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.91 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.79 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.79
K (mg/100 g)	533.19 $\pm$ 19.68 <sup>d</sup>	146.62 $\pm$ 2.75 <sup>a</sup>	294.28 $\pm$ 9.20 <sup>c</sup>	232.87 $\pm$ 3.30 <sup>b</sup>	309.37
Na (mg/100 g)	53.08 $\pm$ 10.40 <sup>a</sup>	48.30 $\pm$ 8.45 <sup>a</sup>	67.14 $\pm$ 10.83 <sup>a</sup>	43.64 $\pm$ 9.50 <sup>a</sup>	54.60
Ca (mg/100 g)	30.24 $\pm$ 5.23 <sup>a</sup>	78.04 $\pm$ 7.84 <sup>b</sup>	81.74 $\pm$ 3.98 <sup>b</sup>	80.13 $\pm$ 11.98 <sup>b</sup>	70.16
Mg (mg/100 g)	8.88 $\pm$ 1.08 <sup>a</sup>	15.44 $\pm$ 0.89 <sup>c</sup>	16.41 $\pm$ 1.64 <sup>c</sup>	13.50 $\pm$ 1.80 <sup>b</sup>	14.03
Mn (mg/100 g)	0.14 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.15 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.08 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.06 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.11
Fe (mg/100 g)	0.92 $\pm$ 0.17 <sup>c</sup>	0.20 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.69 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	0.62 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	0.60
Zn (mg/100 g)	0.68 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.03 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	1.67 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.61 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	0.75
Cu (mg/100 g)	0.22 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.05 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.11 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.06 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.11
Ácido ascórbico (mg/100 g)	4.23 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>	3.49 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>	7.89 $\pm$ 1.17 <sup>c</sup>	1.58 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	4.30
Ácido dehidroascórbico (mg/100 g)	3.83 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	1.15 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	3.16 $\pm$ 2.36 <sup>a</sup>	0.43 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	2.14
Vitamina C total (mg/100 g)	8.06 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	4.77 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	11.54 $\pm$ 1.23 <sup>b</sup>	2.39 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup>	6.69
Ácido oxálico (mg/100 g)	27.83 $\pm$ 1.70 <sup>b</sup>	15.80 $\pm$ 1.99 <sup>a</sup>	239.47 $\pm$ 2.44 <sup>d</sup>	83.52 $\pm$ 1.93 <sup>c</sup>	91.65
Ácido glutámico (mg/100 g)	14.77 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>	5.89 $\pm$ 0.64 <sup>a</sup>	159.78 $\pm$ 5.40 <sup>d</sup>	29.26 $\pm$ 9.06 <sup>c</sup>	51.67
Ácido málico (mg/100 g)	18.94 $\pm$ 2.10 <sup>a</sup>	26.00 $\pm$ 2.86 <sup>b</sup>	275.42 $\pm$ 5.37 <sup>d</sup>	211.07 $\pm$ 6.67 <sup>c</sup>	132.86
Ácido cítrico (mg/100 g)	29.43 $\pm$ 3.03 <sup>a</sup>	23.60 $\pm$ 3.33 <sup>a</sup>	58.33 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	44.10 $\pm$ 1.93 <sup>b</sup>	38.86
Ácido succínico (mg/100 g)	3.23 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup>	1.06 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	Tr	tr	2.14

Muestra 1 = Sitio 1, 2007; Muestra 2 = Sitio 2, 2007; Muestra 3 = Sitio 1, 2008; Muestra 4 = Sitio 2, 2008. tr – traza

Huang y Ren (2013) investigaron la actividad antibacteriana del ajo elefante (*A. ampeloprasum* L.) y la compararon con el ajo común (*A. sativum* L.), confirmando que el ajo elefante suprime la propagación de bacterias relacionadas con la vida diaria. La actividad antimicrobiana del ajo elefante fue más fuerte que la ampicilina *in vitro* cuando se usó contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Staphylococcus* actinomyces y actinomyces grises. Su actividad antimicrobiana no solo es más fuerte que el ajo común, sino también más fuerte que la penicilina para algunas cepas. Posteriormente, confirmaron las actividades anticancerígenas del ajo elefante contra las células de osteosarcoma humano, U2OS.

Caputo *et al.*, (2020), obtuvieron resultados similares, que indican la actividad antibacteriana de *A. ampeloprasum* L. contra *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. carotovorum* y *E. coli*, los extractos de los bulbos fueron más efectivos que los de las partes aéreas. Confirmaron las potencialidades de las especies de *Allium* para combatir bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Terminología “común”

A continuación, se ilustran los términos “comunes” usados para referirse a estructuras bulbosas de *A. ampeloprasum* (Fig. 8).



**Figura 8.** Apariencia externa de estructuras bulbosas de *Allium ampeloprasum* L.

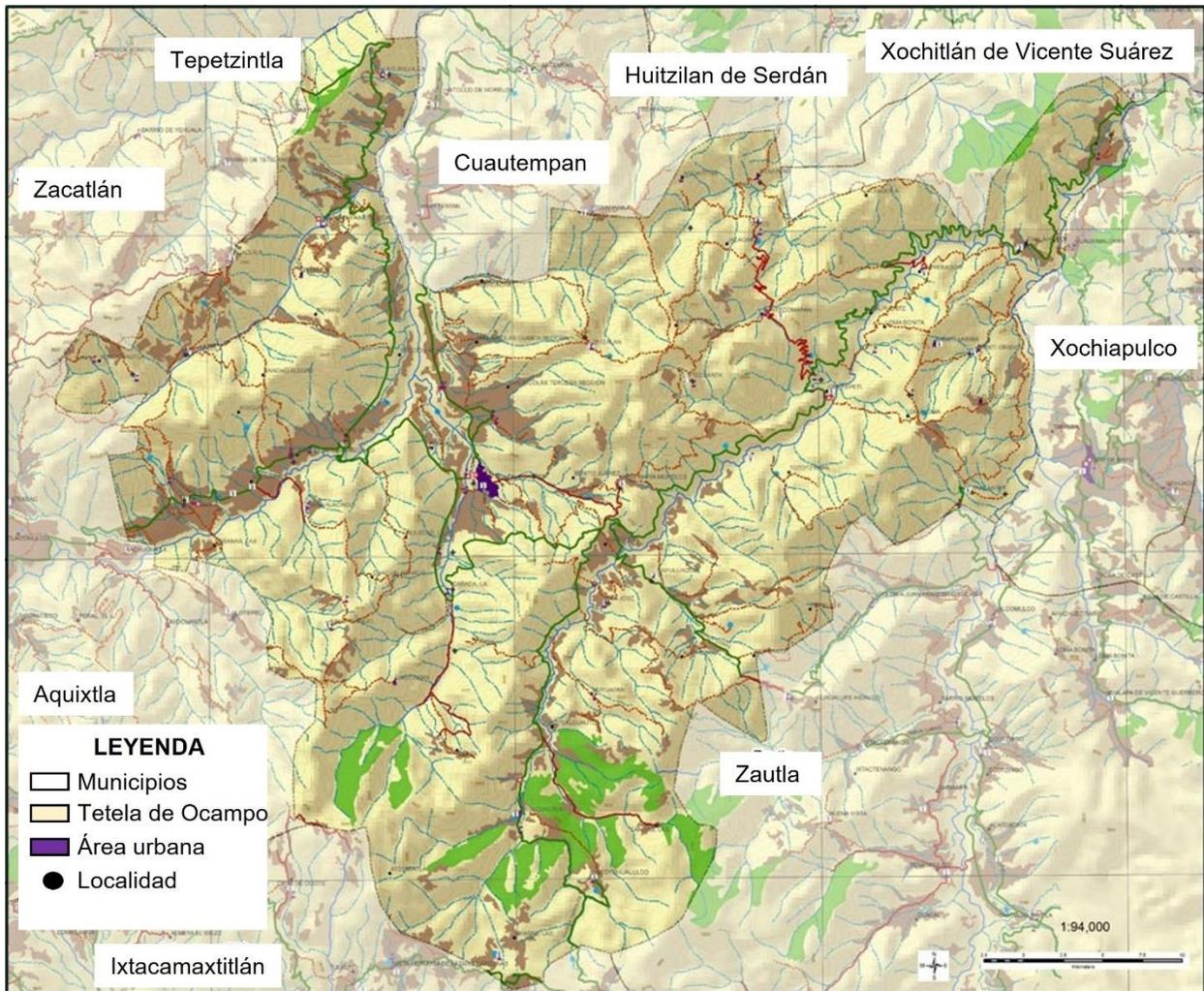
### 4.2 Lugar de cosecha en campo abierto.

La obtención de plantas semilla se realizó el 13 de mayo de 2020, se colectaron 20 plantas completas de ajo elefante “tipo hembras” de cada una de las tres parcelas (total 60 plantas), en etapa de “Maduración de los bulbos y cosecha”, ilustrada en la Figura 13. Estas parcelas se encuentran en la comunidad de San Nicolás (tercera sección), Tetela de Ocampo, Puebla. Las coordenadas geográficas fueron obtenidas mediante el GPS de Google Maps (Fig. 9).



**Figura 9.** Ubicación de parcelas de muestreo: (A) Parcela 1: ubicación Latitud 19.8303706 y longitud-97.8075867; (B) Parcela 2, ubicación: Latitud 19.8300468 y longitud -97.798450; (C) Parcela 3, ubicación: Latitud 19.8332438 y longitud -97.8043659.

El municipio de Tetela de Ocampo se localiza en la parte Norte del Estado de Puebla. Sus coordenadas geográficas son Longitud 97°54'45.00" W 97°38'35.52" W, Latitud 19°41'43.08" N 19°55'40.08" N (Fig. 10), (INEGI, 2021). El lugar del experimento presenta los climas templado húmedo y templado subhúmedo con lluvias en verano, temperatura media anual entre 12 y 18 °C y la precipitación del mes más seco es menor de 40 mm (INIFED, 2021).



**Figura 10.** Ubicación del municipio de Tetela de Ocampo, Puebla (Municipium, 2021).

El material vegetal colectado se trasladó al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, ubicado en Montecillo, México, con coordenadas 19°27'51"N 98°54'15"O / 19.464106, -98.904142 (INEGI, 2021).

Las cabezas se limpiaron, retirando las hojas y raíz, luego se secaron a la luz solar. En este punto se evaluaron variables morfológicas que se especificaran más adelante (apartado 2.5). Posteriormente los dientes fueron desprendidos de las cabezas secas, para ser etiquetados y conservados en bolsas de papel estraza, con el fin de usarlos en la siembra del siguiente ciclo.

#### **4.3 Establecimiento de experimento en Invernadero.**

La siembra de bulbos se realizó en condiciones de invernadero, con la finalidad de documentar las etapas fenológicas del ajo elefante. En los invernaderos del Posgrado en Fisiología Vegetal del Campus Montecillo. La semilla agronómica fueron 35 dientes de la cosecha de cada parcela realizada en campo descrita anteriormente, y los criterios de selección fueron: tamaño, peso y aspecto sanitario.

Los bulbos semilla recibieron tratamiento fitosanitario que consistió en sumergir la semilla una hora en solución compuesta por: vitavax (Arista, Perú), biozyme (Arista, Perú) y adherente AD3000 (PNM, México) en proporción, de acuerdo con las prácticas de los productores de la región.

Después las semillas agronómicas (bulbos semilla) fueron sembradas en bolsas de plástico negras (30 x 30 cm) con suelo (arcilloso), con una semilla por bolsa a 2 cm de profundidad, con orientación acrópeta (ápice hacia arriba). Cada bolsa se etiquetó con el número de planta y parcela colectada. Posteriormente las plantas se muestrearon cada 15 días a lo largo del ciclo de cultivo, a partir de la fecha de brotación.

#### **4.4 Definición de fases y etapas fenológicas.**

Las fases fenológicas se definieron con base en el estado vegetativo, reproductivo y maduración y cosecha del bulbo.

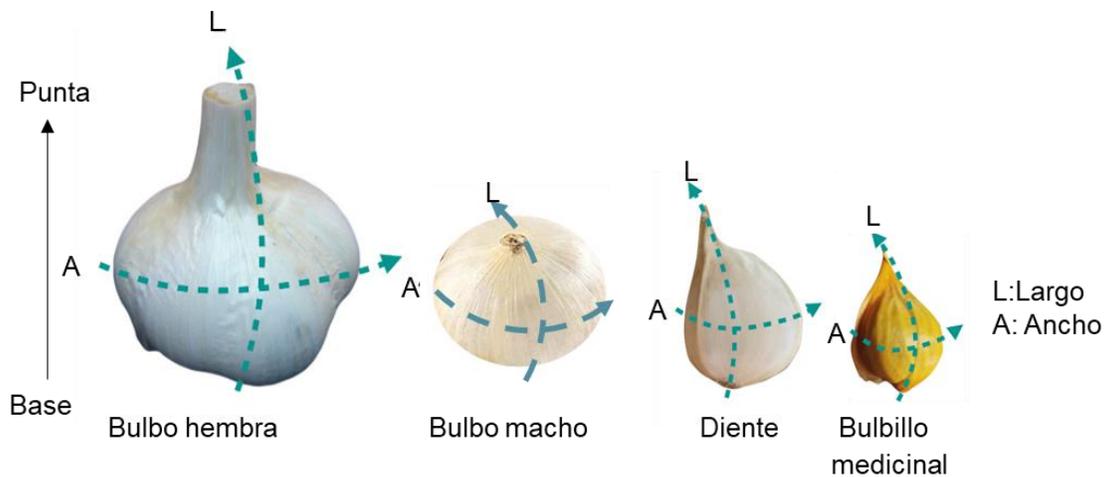
Las etapas fenológicas, se definieron considerando los cambios morfológicos observados como: los cambios en las estructuras vegetativas y reproductivas como: emergencia de las primeras hojas, aparición de lígulas, número de hojas expandidas, alargamiento del escapo, aparición de la inflorescencia, apertura floral, senescencia de

los nomófilos, llenado de los bulbos culinarios, maduración de los bulbos y cosecha, observadas en el primer ciclo de cultivo, realizada en invernadero (2020).

#### 4.5. Variables agronómicas

Las siguientes variables fueron medidas en plantas hembra material fresco, en la etapa de cosecha del ciclo 2021 (Fig. 11).

1. Peso (g) y tamaño de bulbo hembra y macho (cm): largo y diámetro, en la parte media más prominente.
2. Número de dientes por cabeza.
3. Peso (g) y tamaño de dientes cm: largo y diámetro.
4. Número de bulbillos medicinales en bulbos hembras y machos.
5. Peso (g) y tamaño de bulbillos medicinales cm: largo y diámetro.
6. Días desde la siembra a la brotación (resultados reportados en medidas morfológicas para fines prácticos de ésta investigación).



**Figura 11.** Forma de medir largo y ancho en bulbo hembra, macho, diente y bulbillo medicinal.

Las variables morfológicas fueron evaluadas para cada etapa de desarrollo del ciclo 2021.

1. No. de hojas expuestas de la base al ápice de la planta

2. No. de lígulas visibles.
3. Diámetro (mm) del “pseudotallo” (conjunto de la base de los nomófilos envainados): medido al nivel del suelo.
4. Altura (cm) del “pseudotallo”: medida del nivel del suelo a la hoja más joven expuesta.

#### **4.6 Estudio histológico**

##### **Material biológico**

Para el estudio anatómico se muestrearon 10 plantas de cada etapa fenológica. La planta se lavó con agua corriente y se limpió, retirando la raíz y hojas fotosintéticas expuestas. Se cortaron en planos longitudinales medianos y transversales.

#### **4.7 Estudio anatómico con Microscopía de Luz (ML)**

##### *Fijación e inclusión en parafina*

Los bulbos en diferentes etapas de desarrollo se cortaron en plano longitudinal mediano y se fijaron en FAA (52% etílico al 96%+5% ácido acético+10% de formaldehído (al 37-40%) +33% agua) para la obtención de cortes longitudinales medianos.

- 1) El material fijado en FAA se enjuagó con agua corriente en tres tiempos de 30 min.
- 2) Posteriormente el material se deshidrató y embebió en: etanol 50%, 60%, 70%, 80%, 96%, 100%, 100%, etanol-xileno 3:1, etanol-xileno 1:1, etanol-xileno 1:3, xileno 100% y xileno 100%, un cambio en cada uno con duración de cuatro h, en cambiador automático.
- 3) A continuación, se transfirieron las muestras a Paraplast durante 12 h y luego en Paraplast (segundo cambio) durante 24 h. En estufa con temperatura de 65°C.
- 4) Luego el tejido se colocó en bandejas de aluminio con parafina fundida, orientando el espécimen en el plano deseado. Se pusieron en vacío para mejorar la infiltración y de esta forma el Paraplast se dejó solidificar a temperatura ambiente.

- 5) Una vez solidificado el paraplast, se cortaron trozos pequeños en forma de cuadrado o rectángulo, estos se adhirieron a bases de madera mediante calor. Una vez adherido el trozo se desgasto en forma de pirámide para facilitar el corte.
- 6) Se cortó en micrótopo rotatorio Spencer 820 (American Optical, U.S.A), grosor de 10  $\mu$ m, obteniendo una cinta de cortes en serie la cual se observó estéreo microscopio para seleccionar los cortes de interés.
- 7) Los cortes seleccionados se adhirieron en portaobjetos con adhesivo de cromo (0.5% gelatina 1.0% +0.1% fenol +0.5% alumbre de cromo ( $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$ ). Se dejaron secar por 12 h, y posteriormente se colocaron en una platina (55°C) durante 24 h.
- 8) Para remover la parafina se colocaron los cortes en tres cambios de xileno 100% por cinco min. Luego se hidrataron pasando los cortes en etanol 100%, 100%, 96%, 70%, 50%, los cambios se hicieron cada cinco min.

*Tinción con safranina y verde fijo.*

- 1) Los cortes desparafinados y parcialmente hidratados se pasaron a Safranina sódica (0.05% safranina+2% NaCl en agua) durante tres h. Para remover el exceso de Safranina, los cortes se lavaron en tres cambios de agua desionizada, por 10 s cada uno.
- 2) Posteriormente se deshidrataron en etanol 50%, 70%, 96%, 100% (tres minutos en cada concentración), seguido de esto se tiñeron con solución de Verde Fijo (0.12% verde rápido (FCF) en 100% de isopropílico) durante 20 min. La intensidad del color adquirida se revisó cada cinco min.
- 3) Después los cortes se lavaron en etanol 96%, 100% 100% durante tres min para quitar el exceso de Verde Fijo, acto seguido se transfirieron a tres cambios de xileno durante tres min.
- 4) Los cortes teñidos fueron montados con resina sintética (HYCEL, México), y se dejaron secar a 46°C por 48 h.

- 5) Los cortes se observaron con un microscopio óptico compuesto Axiostar Plus (Carl Zeiss, Alemania) y fotografiados con una cámara digital EOS REBEL T6 (Cannon, Taiwan).

#### **4.8 Estudio anatómico con Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).**

Cada planta se lavó con agua corriente y se limpió, retirando la raíz y hojas fotosintéticas, realizamos cortes longitudinales en el sitio de interés.

##### *Fijación.*

Los cortes frescos se fijaron en glutaraldehído al 3% en amortiguador de fosfatos Sorensen (0.1M pH 7.2) durante 48 h, posteriormente se realizaron tres lavados de 30 min cada uno en amortiguador de fosfatos Sorensen pH 7.2 al 0.1 M., los cuales se preparan de la siguiente forma:

glutaraldehído

Solución madre:

Solución A: fosfato de sodio monobásico 0.2 M. 2.34 g en 100 mL de agua desionizada.

Solución B: fosfato de sodio dibásico 0.2 M. 2.84g en 100 mL de agua des ionizada.

Amortiguador de fosfatos Sorensen pH 7.2 al 0.1 M.

Solución A: 28 mL

Solución B: 72 mL.

Para tener una concentración 0.1M se afora a 200 mL con agua des ionizada.

Glutaraldehído al 3% en amortiguador de fosfatos Sorensen 0.1M pH 7.2.

12 mL glutaraldehído (25%)

14 mL solución A

36 mL solución B

Aforar a 100 mL con agua destilada

#### *Deshidratación.*

El material, se deshidrato en alcoholes graduales de 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 100%, un cambio en cada concentración, durante 40 min.

#### *Secado punto crítico y montaje.*

Las muestras fueron colocadas en caja Petri con alcohol al 100%, se etiquetaron y envolvieron en papel lente, a continuación, se metieron en el secador de muestras a punto crítico Samdri-780A (Tousimis, USA) durante una hora.

Los porta muestras de latón se lavaron con jabón “Hiclin plus neutro” durante cinco min. y se enjuagaron con agua desionizada, para luego ser transferidas en un recipiente con acetona al 80%, el recipiente se colocó en un sonificador 1800 (BRANSON, U.S.A.) a frecuencia de 40 kHz durante 15 min. Una vez terminado el tiempo fueron colocadas en recipiente con papel kraft, se secaron al aire bajo la campana de extracción.

Para colocar las muestras en el plano deseado, los tejidos secos se montaron y adhirieron a los porta muestras de latón con una cinta doble adhesiva de aluminio, con estero microscopio CPS160(Nikon, Japón).

#### *Recubrimiento y observación*

Con ayuda de una Ionizadora de metal JFC 1100 (JEOL, U.S.A.) cada muestra se recubrió con oro paladio (80/20) durante tres a cinco min. Finalmente, las muestras se observaron en Microscopio Electrónico de Barrido JSM-6390 (JEOL, Japón).

### **4.9. Variables anatómicas evaluadas**

En los cortes longitudinales medianos de los bulbos en las diferentes etapas fenológicas se realizó descripción cualitativa con énfasis en la diferenciación de los bulbillos medicinales y los cambios histológicos observados.

#### **4.10 Estudio Histoquímico.**

##### *Detección específica de lípidos con Rojo Oleoso.*

1. Se obtuvieron cortes longitudinales (100 µm) de bulbos culinarios y bulbillos medicinales frescos de la etapa siete, con micrótopo manual 20175 (RJUNG AG, Heidelberg) los cuales se colocaron en etanol 50%.
2. Luego los cortes fueron transferidos a etanol 60% durante 2 min.
3. Los cortes se transfirieron al colorante Rojo Oleoso (0.05 g rojo oleoso de aceite +25 ml de 1-butanol +75 ml etilenglicol) durante 24 h, evitando el contacto con el aire.
4. Posteriormente los cortes fueron lavados con etanol 60% durante un min e inmediatamente se transfirieron a etanol al 50 % durante tres min.
5. Finalmente, los cortes fueron montados en portaobjetos con una gota de glicerol, y cubre objetos (No. 1). La observación se realizó en microscopio óptico compuesto o Axiostar Pluss (Carl Zeiss, Alemania) y las imágenes fueron capturadas con cámara EOS REBEL T6 (Cannon, Taiwan).

##### *Detección específica de almidón, tinción con Lugol (I<sub>2</sub>/KI)*

1. Se obtuvieron cortes longitudinales de bulbos culinarios y bulbillos medicinales como se describe anteriormente.
2. Los cortes frescos fueron colocados rápidamente sobre una gota de Iperioduro de potasio sobre portaobjetos y luego cubiertos con cubre objeto.
3. Debido a que es tinción temporal, los cortes fueron observamos de forma inmediata en microscopio óptico compuesto Axiostar Pluss (Carl Zeiss, Alemania) y las imágenes capturadas como arriba se describe.

##### *Detección específica de polisacáridos insolubles con tinción PAS (Ácido periódico-Schiff)*

1. Se obtuvieron cortes longitudinales (100 µm) de tejido fresco de bulbillos medicinales y bulbos culinarios, con micrótopo manual arriba descrito.
2. Los cortes frescos fueron colocados en etanol al 50%.

3. Luego estos fueron transferidos directamente a ácido peryódico (6%) durante 15 min.
4. Posteriormente los cortes fueron transferidos a reactivo de Schiff (0.1 g fuchsina básica+2 ml alcohol etílico 96% +2 g de bisulfito de sodio (NaHSO<sub>3</sub>) +4 g de ácido cítrico+100 ml de agua) durante 10 min, después fueron lavados con agua desionizada durante un min.
5. Para terminar, los cortes fueron montados en una gota de glicerol, observamos en el microscopio óptico Axiostar Pluss (Carl Zeiss, Alemania) y las imágenes capturadas como arriba se describe.

#### *Detección específica de taninos.*

- 1) Se obtuvieron cortes longitudinales (100 µm) de tejido fresco de bulbillos medicinales y bulbos culinarios, con micrótopo manual, arriba descrito.
- 2) Los cortes fueron teñidos directamente, colocamos el tejido fresco en pequeños recipientes de vidrio, se agregaron cinco gotas de solución de vanillina (10% de vanillina en etanol 96%), por tres min, y evitar la deshidratación ya que la solución es preparada con etanol al 96%.
- 3) El excedente de vanillina fue decantado y luego se agregaron dos gotas de HCl al 50% por 30 s, para evitar la precipitación y formación de cristales de la vanillina, aplicamos constantemente HCl.
- 4) Esta tinción es temporal, para finalizar los cortes fueron montados en una gota de glicerol. Observamos rápidamente en microscopio óptico Axiostar Pluss (Carl Zeiss, Alemania) y las imágenes capturadas como arriba se describe.

#### *Detección específica de proteínas.*

- 1) Se obtuvieron cortes longitudinales (100 µm) de tejido fresco de bulbillos medicinales y bulbos culinarios, con micrótopo manual, arriba descrito.
- 2) Los cortes frescos se colocaron en cajas Petri con etanol al 50%.
- 3) Luego, los cortes se pasaron a cajas de cristal con colorante azul negro de naftol en etanol al 50%, durante tres h.

- 4) Después, los cortes se lavaron con etanol al 50% durante un min, y deshidrataron directamente en propanol 100% por 10 min.
- 5) Los cortes fueron colocados en bandejas de cristal con xileno por cinco min.
- 6) Para finalizar los cortes se montaron en una gota de resina. Observamos con microscopio óptico Axiostar PlussPlus (Carl Zeiss, Alemania) y las imágenes capturadas como arriba se describe.

#### *Detección específica de lignina.*

- 1) Se obtuvieron cortes longitudinales (100  $\mu\text{m}$ ) de tejido fresco de bulbillos medicinales y bulbos culinarios, con micrótopo manual, arriba descrito.
- 2) Los cortes se colocaron en cajas de cristal y agregamos 4 gotas de floroglucinol (1-2% floroglucinol en etanol al 96%), esperamos de 30 a 60 sg.
- 3) Luego aplicamos 4 gotas de ácido clorhídrico (HCL) al 50%)
- 4) Para terminar, los cortes fueron montados en una gota de glicerol, observamos en microscopio óptico Axiostar Pluss (Carl Zeiss, Alemania) y las imágenes capturadas como arriba se describe.

#### **4.11 Variables Histoquímicas estudiadas en bulbos en Etapa fenológica 8.**

1. Presencia e histolocalización de taninos.
2. Presencia e histolocalización de proteínas.
3. Presencia e histolocalización de almidón.
4. Presencia e histolocalización lípidos.
5. Presencia e histolocalización de lignina.

#### **4.12 Análisis estadísticos**

Los análisis estadísticos se realizaron con los datos de las variables de producción y morfológicas medidas en plantas hembra, en etapa de cosecha, del ciclo 2021 descrito en la sección 4.5. Datos de producción y morfología de estructuras bulbosas.

Los datos se analizaron con un diseño completamente al azar (INFOSTAT, 2010) y comparación de medias con la prueba de Tukey (INFOSTAT, 2010). Se consideró cada tipo de bulbo como un tratamiento con 50 repeticiones, para cada variable. Los datos se reportan con la media  $\pm$  desviación estándar de la media.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Fenología.

#### *Descripción de etapas y fases fenológicas.*

La fenología vegetal se refiere a la producción periódica de las estructuras vegetativas y reproductivas, es resultado de las interacciones entre factores bióticos y abióticos que determinan el tiempo para el crecimiento y la reproducción de las plantas (Van Schaik *et al.*, 1993; Domínguez y Paz, 2018). Conocer dicho comportamiento de desarrollo del cultivo nos permite determinar sus requerimientos climáticos, hídricos, cantidad y tipo de elemento mineral requerido en cada etapa de desarrollo, con el fin de evitar las deficiencias o excesos, pronosticar la incidencia de plagas, lo cual se vuelve esencial al momento de planificar, estructurar y aplicar algún programa de manejo integrado de plagas, ubicar áreas óptimas para cultivos y generar herramientas para planificar el manejo integrado de cultivo.

El ciclo de cultivo de *A. ampeloprasum* en la región de Tetela de Ocampo, requiere 9 meses. Este ciclo presenta 3 fases:

Fase 1: Crecimiento Vegetativo.

Fase 2: Crecimiento reproductivo.

Fase 3: Maduración de los bulbos y cosecha.

En el ciclo de cultivo se reconocieron 8 etapas fenológicas, definidas de acuerdo a lo descrito anteriormente (Fig.12).

Etapas 1: Bulbo semilla, al momento de la siembra.

Etapas 2: Brotación. Emergencia de las primeras hojas

Etapas 3: Plántula. Presencia de las primeras hojas expandidas con persistencia de tejido de semilla agronómica.

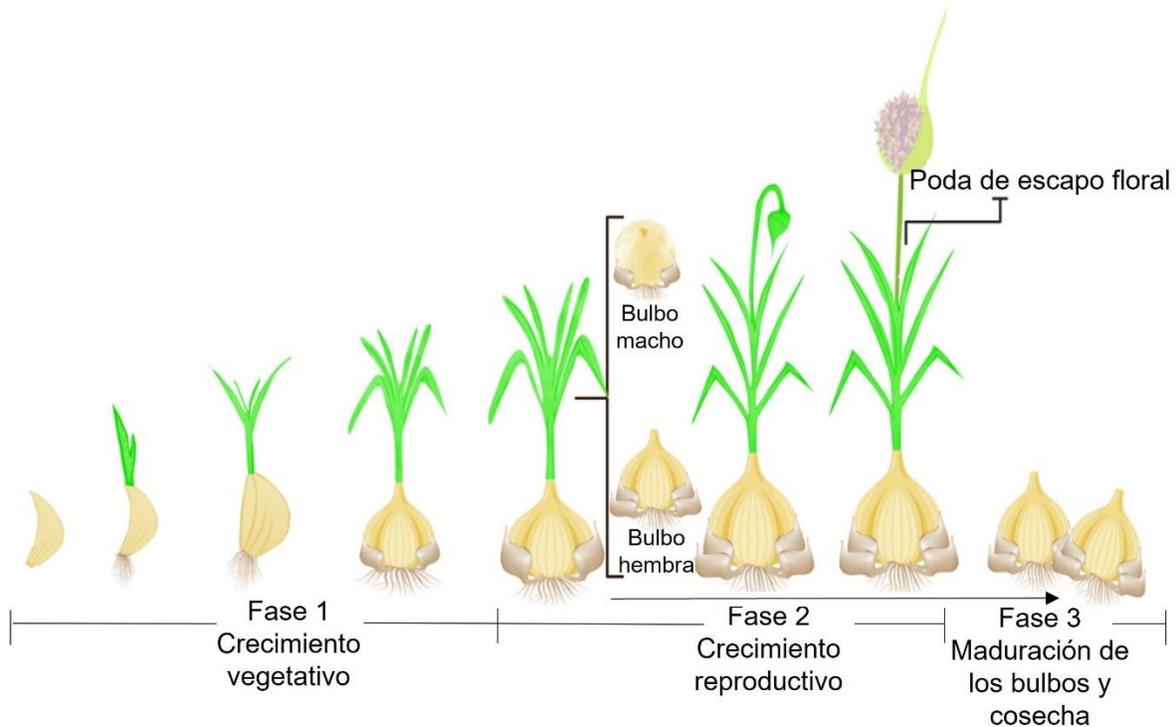
Etapas 4: Planta con 4-6 hojas verdes expandidas (nomófilos).

Etapa 5: Maduración de todos los nomófilos.

Etapa 6: Levantamiento del escapo floral.

Etapa 7: Floración. Apertura de las flores de la inflorescencia.

Etapa 8: Maduración de los bulbos y cosecha.



**Figura 12.** Representación de las fases de *Allium ampeloprasum* L.

### *Fase 1. Crecimiento vegetativo*

Esta primera fase dura  $151.86 \pm 20.10$  días, abarca desde la siembra (etapa 1) hasta el término de la etapa 4, la cual se caracteriza en por la aparición de lígulas en los nomofilos y por el inicio de la diferenciación de los bulbillos medicinales en la etapa 4 (Cuadro 5).

Factores como, la época de siembra, tamaño y peso de la semilla, influye en los días de la siembra a brotación (DSB), tamaño y peso de la cabeza cosechada (Lanzavechia, 2007). En el presente estudio, los DSB fueron de 15 a 55 días y

presentaron variación (Media: 12.96 y CV: 38.91). A pesar de la selección de semilla realizada, el rango de brotación fue grande, por lo que se infiere que la fecha de siembra influyo en este resultado, ya que se hizo en agosto, dos meses antes de lo recomendado (octubre).

La especie pasa de  $57.72 \pm 13.46$  a  $125 \pm 12.35$  días en etapa de plántula, tiempo promedio en que tarda en descomponerse los catafilos de reserva del diente semilla y a su vez, en la parte aérea, tiempo que tardan en madurar los primeros nomofilos, acontecimiento caracterizado por la aparición de las primeras lígulas.

La etapa 4 fue muy importante para el propósito de esta investigación, se caracterizó por el crecimiento vegetativo en la parte aérea, sin embargo, el desarrollo de la base de las hojas para formar el bulbo principal fue mínimo. Los resultados demuestran que el periodo de duración es corto (26 días), durante el cual, el cambio más significativo fue el inicio de la diferenciación de los bulbillos medicinales; la cual se caracterizó por el desarrollo de los meristemas axilares de las hojas basales. Posteriormente estos meristemas axilares forman una yema pequeña y bulbosa que se levanta entre las axilas de las primeras hojas en maduras y totalmente expandidas (lígula expuesta). En esta etapa la planta exhibe de 4- 6 nomófilos totalmente expandidos con lígulas expuestas (Cuadro 5). El diámetro del "pseudotallo" alcanzo medidas de  $2.06 \pm 0.47$  cm, y altura de  $14.99 \pm 4.12$  cm.

En la etapa 5 no se observó diferenciación de nuevos bulbillos medicinales, los bulbillos diferenciados en la etapa 4 solo crecen, pero no se forman nuevos.

### *Fase 2. Crecimiento reproductivo*

La transición del meristemo apical vegetativo a reproductivo ocurre solo en plantas con seis a ocho hojas y primordios foliares (Kamenetsky y Rabinowitch, 2001). En *A. ampeloprasum* la fase reproductiva inicio visiblemente en la parte aérea con la maduración de todos los nomófilos, se observaron  $7.50 \pm 1.16$ , a partir del día  $151.86 \pm 20.10$ .

En los bulbos hembra se empezaron a formar las yemas que más tarde dieron origen a los dientes y al mismo tiempo se empieza a diferenciarse el escapo floral. En las hojas basales, que fueron las primeras en formarse y madurar, y de cuyas axilas se originaron los bulbillos medicinales empiezan a desaparecer.

El levantamiento del escapo floral se observó a los  $190.30 \pm 8.71$  días, posteriormente la floración, caracterizada por la apertura de la espata inicio en el día  $222.60 \pm 11.75$ .

La fase completa de reproducción duró 118 días y se observó un aumento importante en la acumulación de masa tanto de la parte aérea como subterránea. La formación de dientes fue aumentando gradualmente hasta casi completar el tamaño del bulbo que se formaría durante todo el ciclo de cultivo (Fig. 13). La planta alcanzo altura promedio de  $36.50 \pm 5.84$  cm y diámetro robusto en el “pseudotallo” de  $3.32 \pm 0.54$  cm, esto indica que es una planta con mucho vigor.

### *Fase 3. Maduración del bulbo y cosecha*

La fase 3 es la última fase del ciclo del cultivo, la cual inicio en el día  $266.80 \pm 3.32$  y terminó 30 días después. Al inicio de esta etapa se observó que el bulbo termina de completar su llenado evidenciado por el prominente el engrosamiento del bulbo y formación de dientes. Con respecto al tamaño del “pseudotallo” formado por las vainas de las hojas, las variedades de Barretero y Calerense de *A. sativum*, cultivadas en Zacatecas, Méx., tienen altura de 21.2 cm-20.7cm y diámetro 1.84 cm-1.61 cm respectivamente (Reveles *et al.*, 2017), en contraste la colección de *A. ampeloprasum* cultivada en Tetela de Ocampo, es más alta ( $39.88 \pm 4.76$ cm) y robusta ( $3.59 \pm 0.53$  cm).

El crecimiento del bulbo se acelera una vez que emerge el escapo floral. Como practica agronómica el escapo es cortado inmediatamente después de su emergencia lo que favorece la acumulación de fotosintatos en el bulbo. Entonces, se puede decir que el crecimiento del bulbo desde el levantamiento del escapo floral a la cosecha dura aproximadamente 76 días.

A partir de que el cultivo entra en la Fase 3. Maduración del bulbo y cosecha, los cambios son mayormente visibles en la parte aérea, debido a que las hojas inician el proceso de senescencia, esto implica inicialmente la redistribución y exportación de nutrientes a otros órganos, en este caso al bulbo (Roberts *et al.*, 2012; Woo *et al.*, 2019). El principal síntoma observado fue el amarillamiento de las hojas basales, ocasionado por la degradación de la clorofila. Una vez que la redistribución ha sido completada, ocurre la muerte celular del tejido foliar apreciado por la marchitez de las hojas. El momento oportuno para cosechar el ajo es cuando del 40-60 % de las hojas (nomófilos) se han secado, el resto de las hojas deben estar verdes ya que la base de estas, son las que posteriormente servirán de protección al bulbo una vez que se sequen y endurezcan.

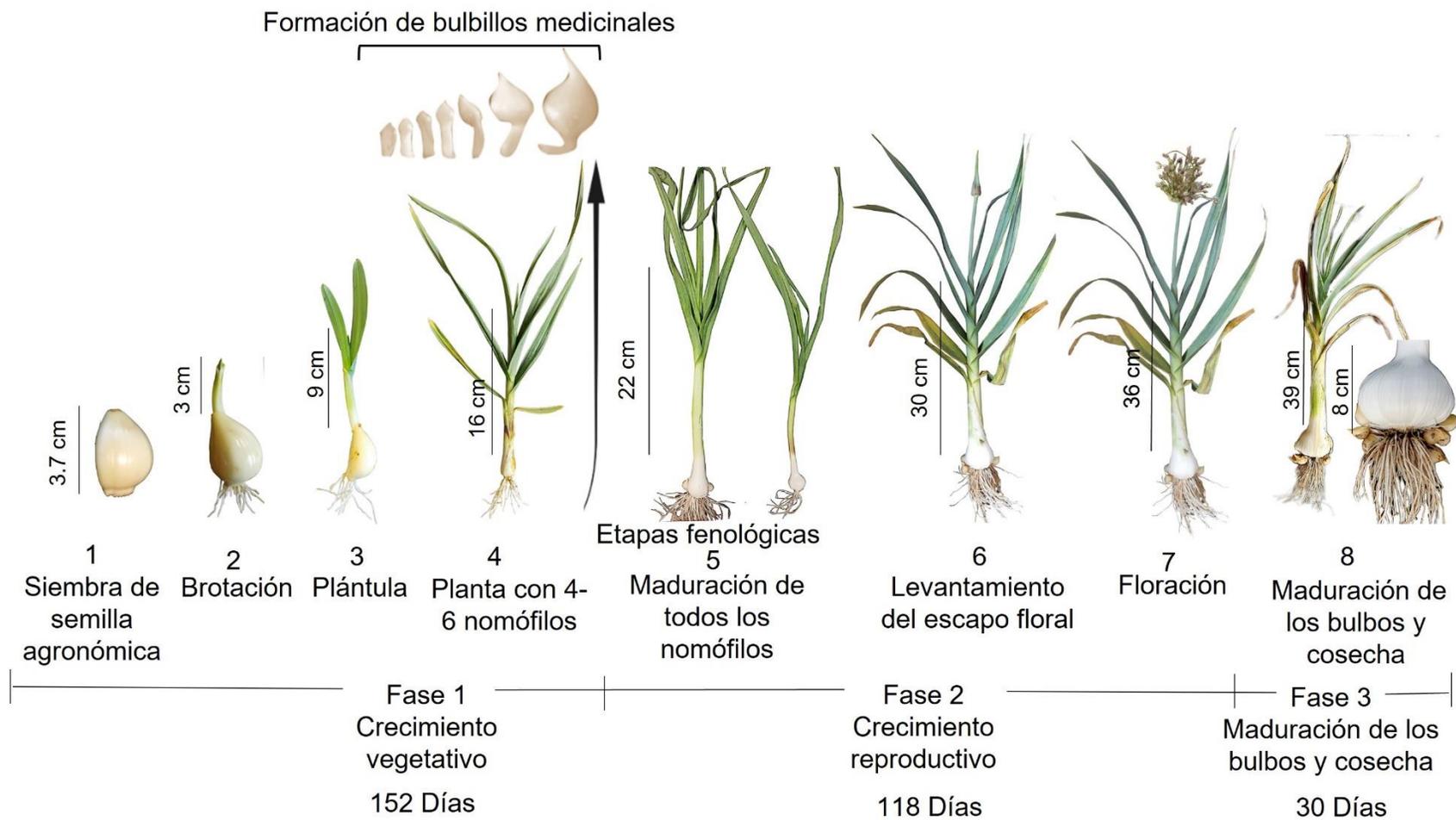
**Cuadro 5.** Variables morfológicas, medidas en plantas de *Allium ampeloprasum* L.

<b>Etapa</b>	<b>Variable</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>D.E</b>	<b>E.E</b>	<b>Mín.</b>	<b>Máx.</b>
Bulbo (E1)	Días	50	0	0	0	0	0
	Núm. Hojas	50	0	0	0	0	0
	Núm. Lígulas	50	0	0	0	0	0
	Altura (cm)	50	0	0	0	0	0
	Diámetro (cm)	50	0	0	0	0	0
Brotación (E2)	Días	50	33.30	12.96	1.25	15.00	55.00
	Núm. Hojas	50	1.56	0.50	0.07	1.00	2.00
	Núm. Lígulas	50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Altura (cm)	50	5.93	2.46	0.35	1.70	13.60
	Diámetro (cm)	50	1.04	0.18	0.03	0.50	1.50
Plántula (E3)	Días	50	57.72	13.46	1.90	32.00	85.00
	Núm. Hojas	50	5.20	1.50	0.21	2.00	8.00
	Núm. Lígulas	50	1.46	0.61	0.09	0.00	2.00
	Altura (cm)	50	10.13	3.43	0.48	3.30	17.00
	Diámetro (cm)	50	1.40	0.20	0.03	0.90	1.90
Planta con 4-6 hojas verdes (E4)	Días	50	125.00	12.35	1.75	103.00	147.00
	Núm. Hojas	50	7.80	0.95	0.13	6.00	10.00
	Núm. Lígulas	50	4.58	0.57	0.08	4.00	6.00
	Altura (cm)	50	14.99	4.12	0.58	7.40	27.00
	Diámetro (cm)	50	2.06	0.47	0.07	1.40	2.90
Maduración de todos los nomofilos (E5)	Días	50	151.86	20.10	2.84	112.00	170.00
	Núm. Hojas	50	7.50	1.16	0.16	5.00	10.00
	Núm. Lígulas	50	7.50	1.16	0.16	5.00	10.00
	Altura (cm)	50	20.09	1.52	0.21	17.30	25.00
	Diámetro (cm)	50	2.66	0.31	0.04	1.40	2.90
Levantamiento del escapo floral(E6)	Días	50	190.30	8.71	1.23	180.00	200.00
	Núm. Hojas	50	7.54	0.99	0.14	6.00	10.00
	Núm. Lígulas	50	7.54	0.99	0.14	6.00	10.00
	Altura (cm)	50	30.43	5.15	0.73	23.00	44.00
	Diámetro (cm)	50	2.52	0.65	0.09	1.80	4.70

**Cuadro 6.** Variables morfológicas, medidas en plantas de *Allium ampeloprasum* L. Continuación **Cuadro 5.**

<b>Etapa</b>	<b>Variable</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>D.S</b>	<b>E.E</b>	<b>C.V</b>	<b>Mín.</b>	<b>Máx.</b>
Floración (E7)	Días	50	222.60	11.75	1.66	5.28	210.00	240.00
	Núm. Hojas	50	9.92	1.45	0.21	14.66	8.00	14.00
	Núm. Lígulas	50	9.92	1.45	0.21	14.66	8.00	14.00
	Altura (cm)	50	36.50	5.83	0.82	15.97	26.00	49.00
	Diámetro (cm)	50	3.32	0.54	0.08	16.11	2.60	4.70
Maduración de los bulbos y cosecha (E8)	Días	50	269.60	17.37	2.46	6.44	250.00	300
	Núm. Hojas	50	9.70	1.49	0.21	15.34	8.00	14.00
	Núm. Lígulas	50	9.70	1.49	0.21	15.34	8.00	14.00
	Altura (cm)	50	39.88	4.76	0.67	11.94	32.00	49.00
	Diámetro (cm)	50	3.59	0.53	0.08	14.82	2.90	4.70

- N: Número total de plantas muestreadas; DS: Desviación estándar de la media, EE: Error estándar de la media, C.V: Coeficiente de variación; Mín.: Mínimo, Máx.: Máximo.



**Figura 13.** Etapas fenológicas del cultivo de *Allium ampeloprasum* L.

Debido a que la siembra, en la presente investigación, se estableció a principios de agosto, se obtuvo un ciclo de cultivo prolongado (300 días) (Fig.13). En esta época se establece la agricultura de temporal en la región. La principal ventaja en este sistema es la cosecha temprana, que tiene mayor rentabilidad, aunque su rendimiento es menor 4,000 kg/ha de bulbos machos y hembras, y 400 kg/ha de bulbillos medicinales.

Otro sistema de siembra es de riego programado, en este caso la duración promedio del ciclo completo se reduce significativamente (210 días), la fecha de siembra es a principios de octubre y la cosecha a finales de abril, en este sistema el rendimiento alcanza de 12,000 a 13,000 kg/ha de bulbos hembras y machos, la producción de bulbillos medicinales es de 900,100 kg/ha aproximadamente (comunicación personal, Adolfo Ibarra Posadas<sup>1</sup>).

## 5.2 Caracteres agronómicos.

Los bulbos hembra de *A. ampeloprasum* L están cubiertos por catáfilas secas, de color blanco, el número promedio de dientes por bulbo es de  $5.41 \pm 1.827$ , cuyo color es blanco crema, cubiertos individualmente por un catáfilo basal seco, de coloración blanco y un segundo de color café claro (Fig. 14), se encuentran distribuidos de manera radial que emergen del tallo corto y aplanado. Son más grandes (largo  $4.91 \pm 1.42$  cm y ancho  $2.62 \pm 0.66$  cm) en comparación con los producidos por la variedad "Perla Orión" (largo 3.2 cm, ancho 2.6 cm) de *A. sativum*, cultivada en Aguascalientes, Méx. (Macias *et al.*, 2021).

La producción promedio de bulbillos medicinales fue de  $9.89 \pm 3.41$ . Los resultados (Cuadro 6) indican que la colección de material biológico presente en Tetela de Ocampo, produce dientes con tamaño (largo:  $5.74 \pm 1.22$  cm; diámetro:  $7.00 \pm 1.35$  cm) y peso ( $119.11 \pm 74.81$  g) similares a los producidos en Chile y Argentina (Wolf 2004; Lanzavechia 2007), pero probablemente menos pesados y más chicos que los bulbos producidos en el área del Archipiélago de Chiloé, donde se alcanzan pesos de 600 g (Pertierra, 2020).

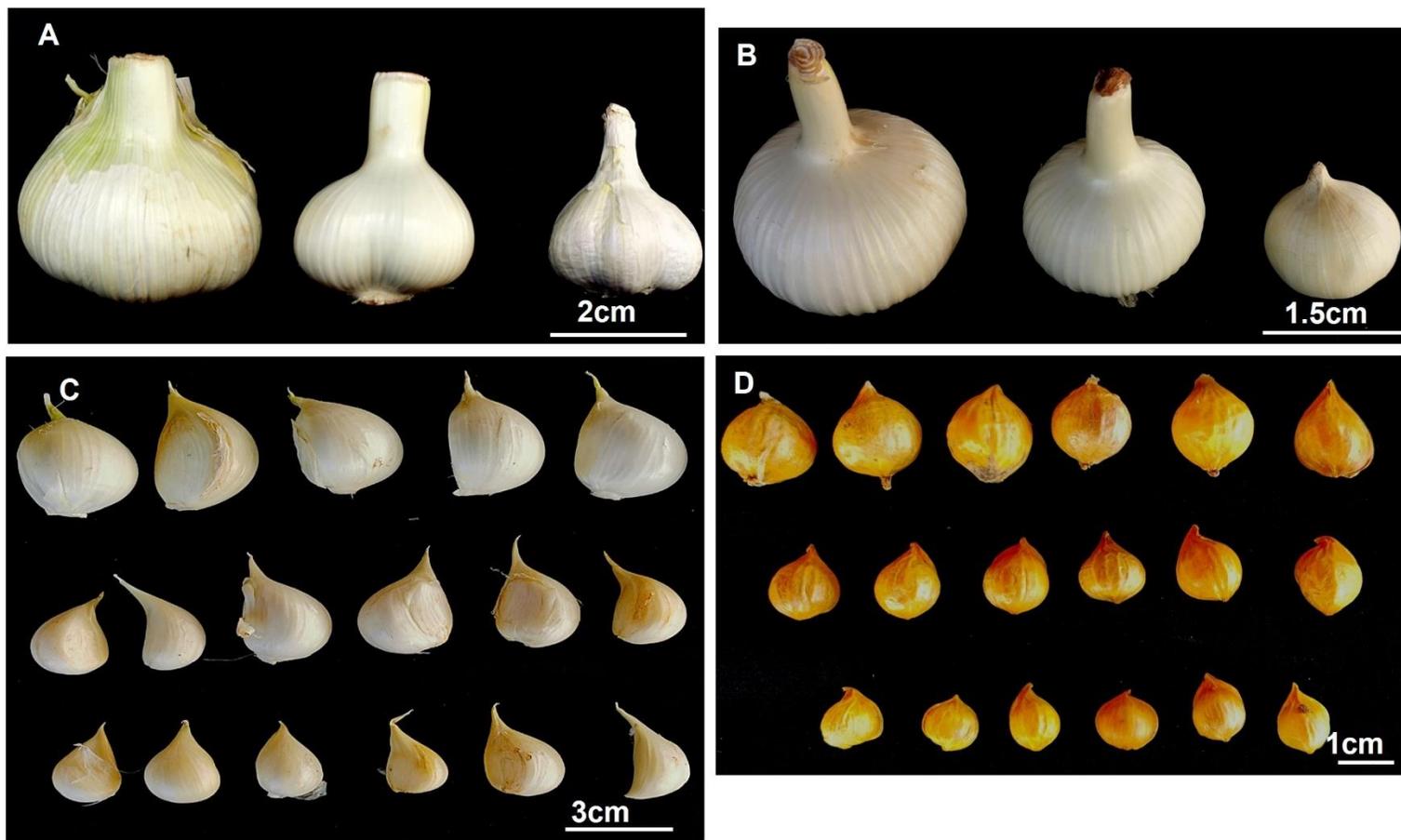
---

<sup>1</sup> Agricultor, colaborador y productor regional, que tradicionalmente cultiva ajo en la región de Tetela de Ocampo, Puebla.

Los bulbos machos tienen menor peso ( $32.29 \text{ g} \pm 16.34 \text{ g}$ ) en comparación a los bulbos hembras. Al igual que los bulbos hembra los bulbos macho están cubiertos por catafilos de color blanco, con textura lisa-regular, pero con un bulbo o diente. de forma esférica y estos producen en promedio  $3.67 \pm 1.37$  bulbillos medicinales pequeños. El tamaño y peso de los bulbillos medicinales son significativamente más pequeños que los bulbos o dientes de la planta hembra y macho. Su tamaño es una cualidad, porque son adecuados para ingerirse de manera directa. La coloración del catafilo basal cambia a lo largo de su desarrollo, al final obtiene color amarillo ocre, y en algunos casos coloración marrón (en bulbillos basales).

**Cuadro 7.** Variables agronómicas del bulbo hembra y macho y sus componentes (dientes y bulbillos medicinales) de *Allium ampeloprasum* L., en etapa 8:

Tipo de bulbo	Variable	(n)	Media	D.E	E.E	Mín.	Máy.
Bulbo hembra	Largo (cm)	63	5.74	1.22	0.15	3.90	8.20
	Diámetro (cm)	63	7.00	1.35	0.17	4.20	10.30
Dientes	Peso (g)	63	119.11	74.81	9.42	32.00	360.00
	Núm., de dientes	63	5.41	1.82	0.23	3.00	9.00
	Núm., de BM	45	9.89	3.41	0.51	4.00	16.00
	Largo (cm)	87	4.91	1.42	0.15	2.20	7.50
Bulbo macho	Diámetro (cm)	87	2.62	0.66	0.07	1.20	4.00
	Peso (g)	87	20.42	11.78	1.26	4.70	43.00
	Largo (cm)	90	3.90	0.61	0.06	2.50	5.20
	Diámetro (cm)	90	4.19	0.70	0.07	2.80	5.70
Bulbillo medicinal (BM)	Peso (g)	90	32.29	16.34	1.72	7.00	78.00
	Núm., de dientes	90	1.00	0.00	0.00	1.00	1.00
	Núm., de BM	30	3.67	1.37	0.27	2.00	6.00
	Largo (cm)	62	2.55	0.48	0.06	1.40	3.50
Bulbillo medicinal (BM)	Diámetro (cm)	62	1.72	0.31	0.04	1.10	2.70
	Peso (g)	62	1.77	0.92	0.12	0.80	2.95



**Figura 14.** Tipos de bulbos en plantas hembra y machos de *Allium ampeloprasum* L.: (A) Bulbos de la “planta hembra”; (B) Bulbos de la “plantas macho”; (C) Dientes de bulbos hembra; (D) Bulbillos medicinales. Los bulbos de “plantas macho” no desarrollan dientes, solo están formados por las bases de las hojas ensanchadas como en la cebolla (*Allium cepa* L.).

De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de varianza (anexos) y comparación múltiple de medias realizada con la prueba Tukey ( $\alpha=0.05$ ), se concluye que en las variables de: Largo, diámetro y peso, los bulbos hembra, macho y bulbillo medicinal, son estadísticamente diferentes, se comprueba que el bulbo hembra tiene mayor tamaño, peso y producen mayor número de bulbillos medicinales (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Comparación de medias, de variables medidas en bulbo hembra, macho y BM de *Allium ampeloprasum* L., en etapa 8.

Tipo de bulbo	Variable			
	Largo (cm)	Diámetro (cm)	Peso (g)	Producción de BM
Hembra	5.74 a*	7.00 a	119.11 a	9.89 a
Macho	3.90 b	4.19 b	32.29 b	3.18 b
Bulbillo medicinal (BM)	2.55 c	1.72 c	1.77 c	

Número de muestras: Hembra (n=63); Macho (n=90); bulbillo medicinal (n=62)- \* Letras diferentes dentro de cada columna son significativamente diferentes (Tukey  $\alpha=0.05$ )

### 5.3. Anatomía del desarrollo de bulbillos medicinales.

#### *Etapa 1.*

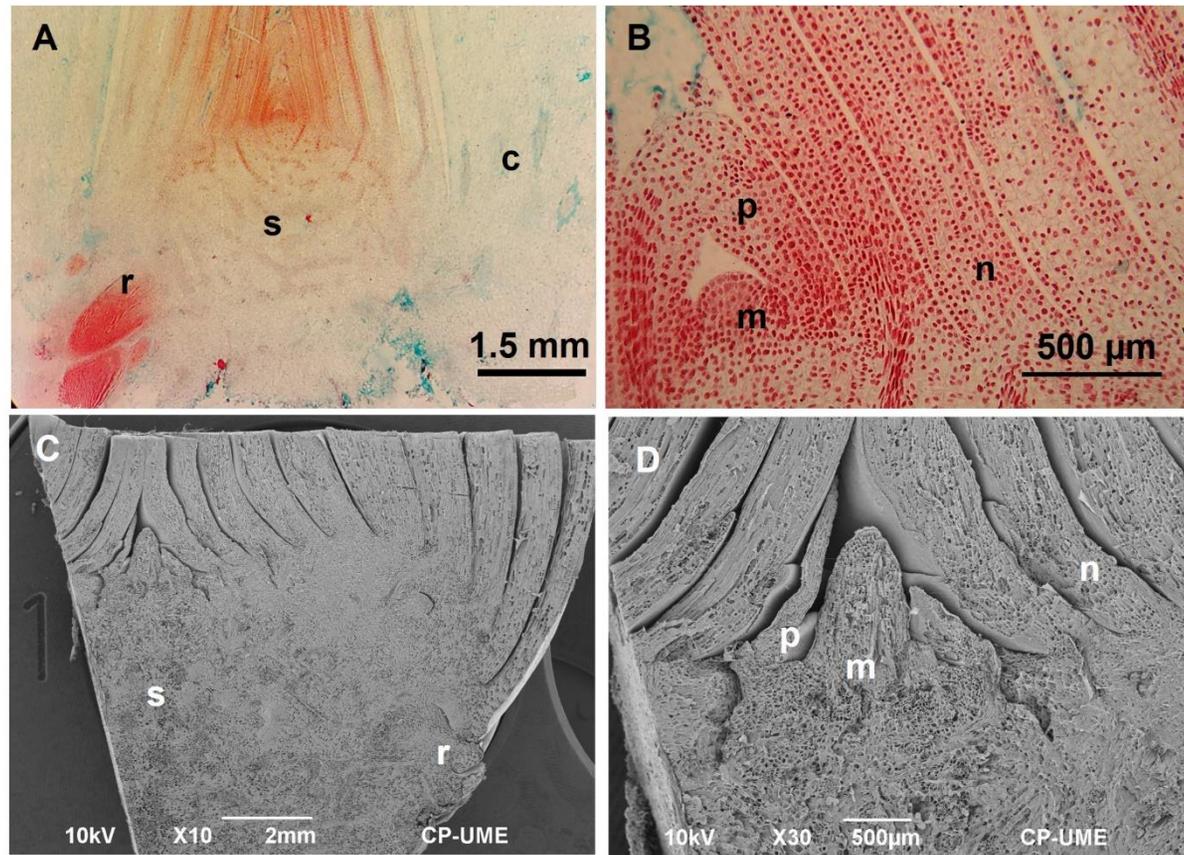
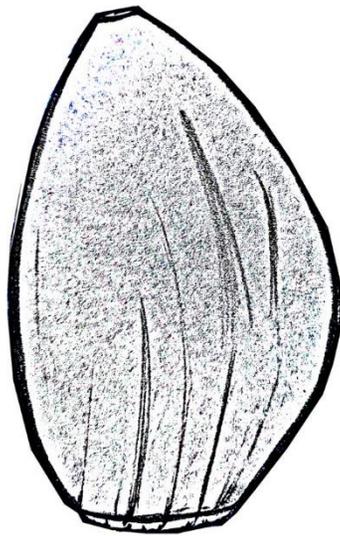
En la figura 15 se presenta la morfología y anatomía interna del bulbo semilla. En cortes medianos se apreció la estructura de tallo muy corto, en el ápice un meristemo apical rodeado de hojas juveniles (8-9) con casi no entrenudos. Las hojas basales convertidas en catáfilos (hojas modificadas): externamente el diente está cubierto por 3-4 hojas modificadas secas y papiráceas que protegen al bulbo diente, inmediatamente debajo hay 1-2 catafilos engrosados, y de reserva, que forma la parte carnosa del diente. En corte longitudinal mediano del “diente semilla” el meristemo apical es pequeño y en posición apical con respecto al tallito y central con respecto al diente. En el meristemo se reconocen una túnica externa y el corpus o cuerpo en posición central (Fig. 15 A, B). La túnica solo presenta divisiones anticlinales y el cuerpo anticlinales y periclinales (Fig. 15 A, B). La iniciación de un primordio foliar está asociada con el aumento en la frecuencia

de las divisiones periclinales subepidérmicas en posición periférica al meristemo, se puede observar el alargamiento de los primordios foliares.

La formación de un nuevo primordio de hoja comienza como protuberancia en la periferia cercana del meristemo apical del diente semilla después de ser plantado. El primer primordio de hoja meristemática se convierte en un anillo completo parcialmente levantado que forma una hoja envainada; el siguiente primordio foliar se origina en posición opuesta al primero al anterior, pero en posición más apical y opuesta al anterior. La aparición de las nuevas hojas es acrópeta, las hojas más viejas van ocupando posición basal.

De igual forma en la posición basal del tallo se observaron los meristemas responsables de la diferenciación de nuevas raíces adventicias. En el corte histológico se distingue un grupo de células meristemáticas que forman un cono meristemático, (Fig. 15A) el cual formara el primordio radical el cual tiene geotropismo, porque al emerger se dirigirá al suelo para formar el sistema radical adventicio de la nueva plántula (Fig. 13).

En los cortes observados en microscopia de luz y MEB, se demostró que no hay pe-existencia o diferenciación de yemas embrionarias de bulbillos medicinales, en las axilas de los catafilos del bulbo semilla.



**Figura 15.** Etapa 1. Anatomía del bulbo semilla en cortes longitudinales de *Allium ampeloprasum* L.: (A, B) Estructura interna del meristemo apical del bulbo semilla, corte histológico de parafina teñido con safranina-verde fijo FCF; (C, D) Micrografía de Microscopía Electrónica de Barrido de la zona meristemática. a, axila; c, catáfilo; m, meristemo apical; p, primordio foliar; r, primordio de raíz; rc, catáfilo de reserva; s, tallo.

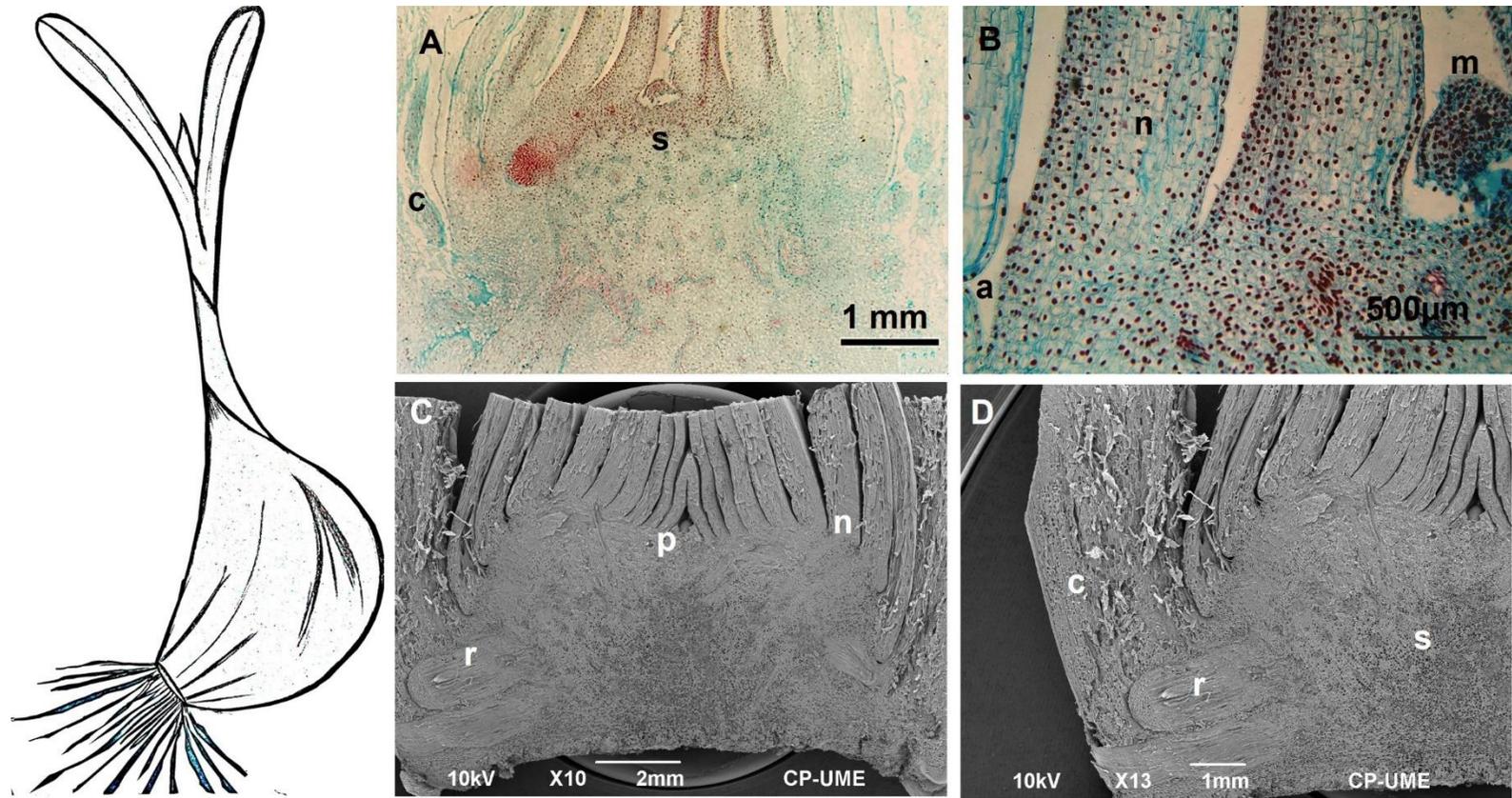
### *Etapas 2 y 3.*

La etapa 2 coincide con la brotación. En esta etapa sucede la emergencia, alargamiento y reverdecimiento de las primeras hojas (nomófilos) preformadas en el bulbo semilla descritos en la Etapa 1. En el presente estudio no se incluye la descripción histológica porque no se registraron eventos anatómicos asociados con la diferenciación de los bulbillos medicinales.

En la Etapa 3, las hojas juveniles envainadas aumentaron en número, crecieron y la base se engrosó. Se formaron nuevos primordios foliares en el meristemo apical, los cuales crecieron, incrementando el grosor del nuevo bulbo y desplazando al catafilo de reserva (diente semilla). En esta etapa el catáfilo de reserva de el diente semilla quedó en posición externa y disminuido en tamaño debido a que fue consumido y usado como reserva durante la germinación y establecimiento de la plántula. A diferencia de la etapa 1, el meristemo apical se observó más alargado, y caracterizado por alta actividad de división celular para la formación de nuevos primordios foliares (Fig. 16A). Las raíces se originaron muy temprano y de manera adventicia, a partir de los centros meristemáticos ubicados en la región del tallo. Las raíces emergieron y crecieron horizontalmente antes de curvarse para continuar su crecimiento hacia abajo (geotropismo) (Fig. 16D). Se puede observar en raíces distintas, la formación de tres zonas importantes; 1: Cofia; 2: Zona meristemática; 3: Zona de elongación. Así mismo, se diferencia la entrada del procambium vascular. En MEB se puede observar como las hojas más viejas (basales) envuelven a las más jóvenes (Fig. 16C). La parte aérea de las vainas de las hojas (nomófilos) forman el pseudotallo (conjunto de vainas aéreas envainadas). En la Etapa 3, aún no se observa formación de primordios de bulbillos medicinales en las axilas de los nomofilos (Fig. 16).

### *Etapa 4.*

En esta etapa los nomófilos de la planta presentan lígulas expuestas, evidencia del término de la expansión y de su madurez. Las hojas de *A. ampeloprasmum* son simples, tienen una lámina planada cuyos márgenes son continuos y lisos, su crecimiento es determinado caracterizado por la exposición de la lígula, al término del alargamiento.



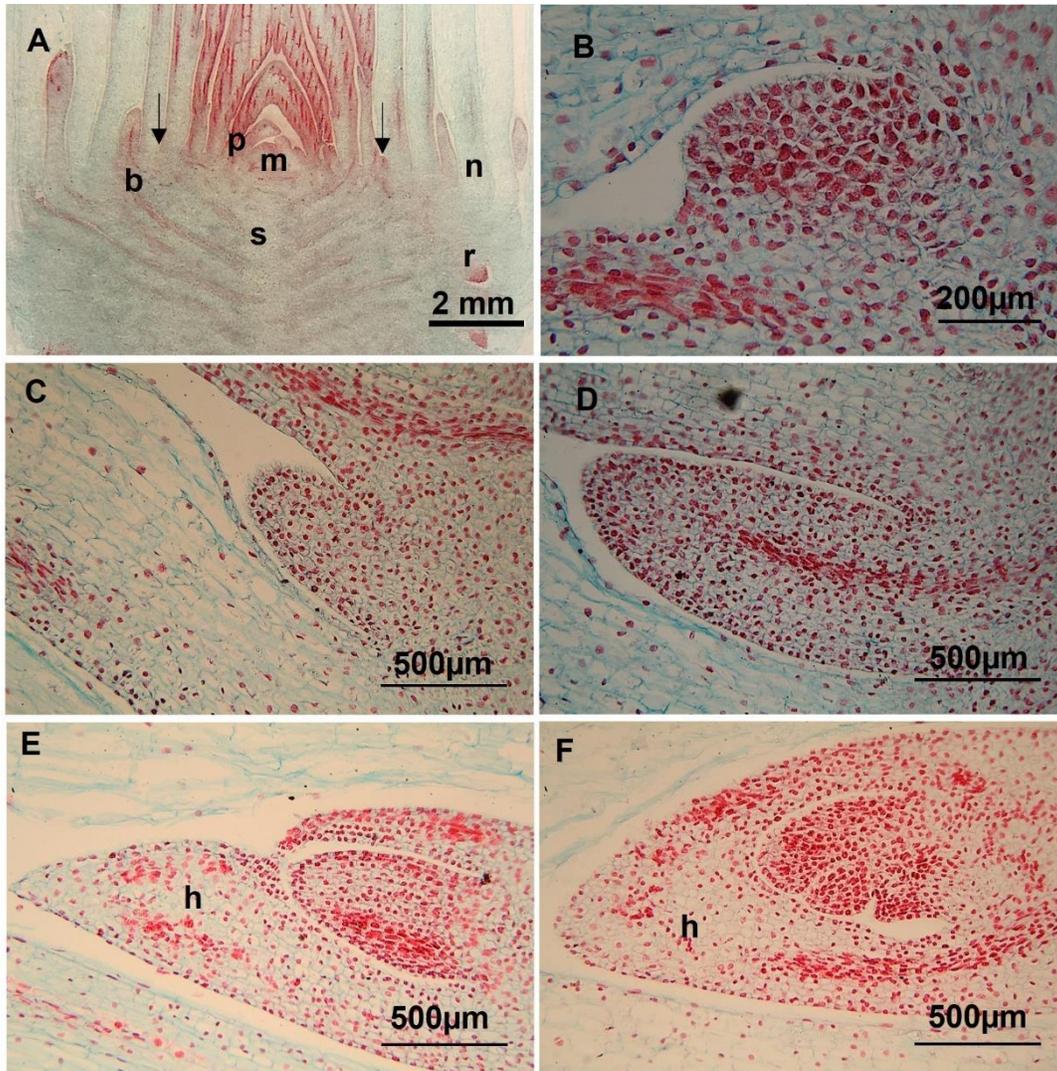
**Figura 16.** Etapa 3. Anatomía en corte mediano de plántula *Allium ampeloprasum* L.: (A, B) corte de parafina teñido con safranina-verde fijo FCF; (C, D) Micrografía de Microscopía Electrónica de Barrido del corte mediano de la plántula. a, axila; c, catáfilo de reserva (diente de ajo); m, meristemo apical; n, base de nófilo; p, primordio foliar; r, primordio de raíz; s, tallo.

Cuando la planta presenta de cuatro a seis hojas con lígula expuesta, inicia la formación de los primeros bulbillos medicinales, primero de meristemas que emergen en las axilas de nomofilos basales y luego van apareciendo nuevos primordios de bulbillos en pares, de manera decusada (un par opuesto al siguiente) en dirección acrópeta (de la base hacia la punta) de forma gradual hacia los nomofilos jóvenes (Fig. 17 A, 19 A).

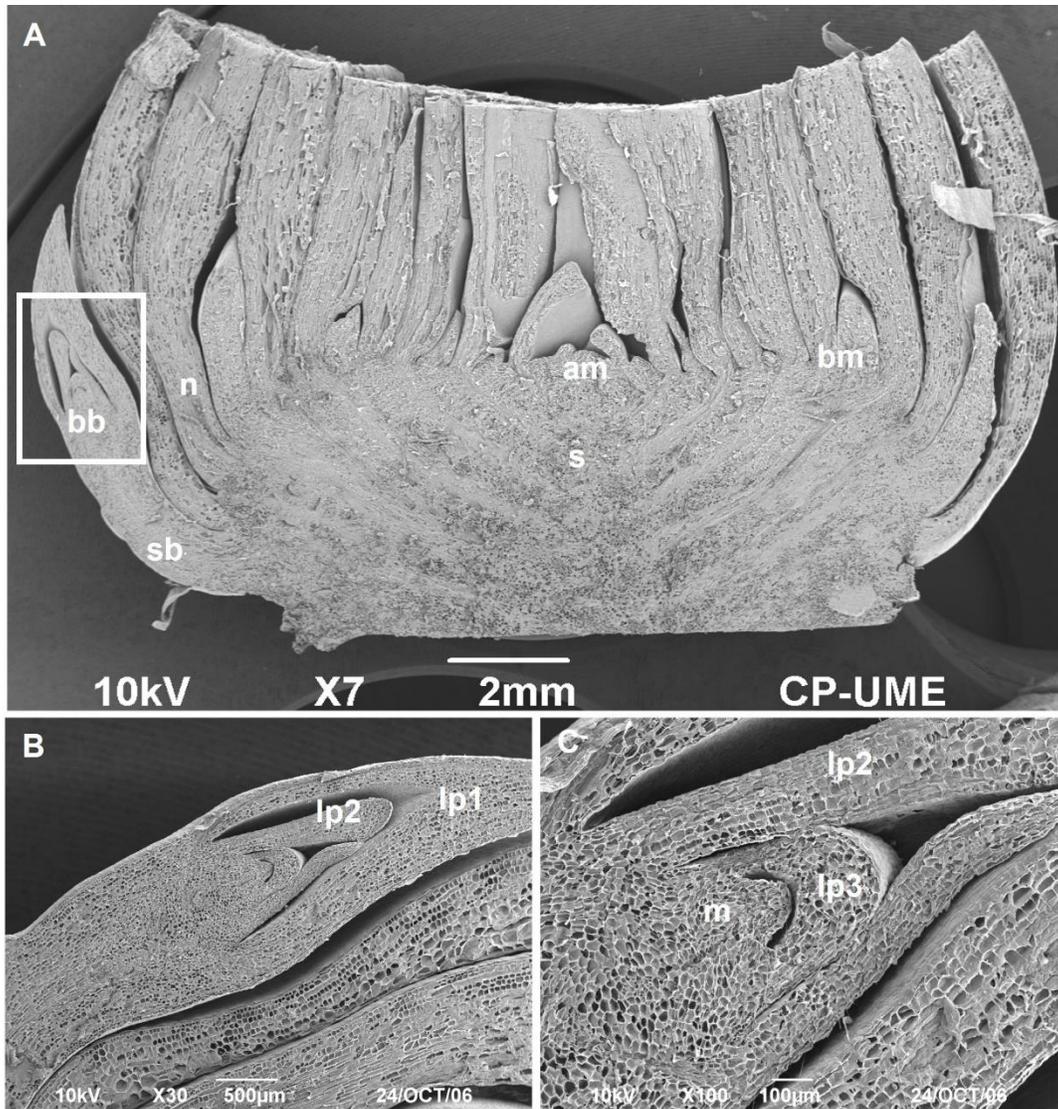
En la etapa 4, el tejido de reserva del catafilo (diente semilla) es ausente (Fig. 17A). El inicio del meristemo de bulbillo comienza como una protuberancia de células pequeñas, isodiamétricas, con núcleos prominentes teñidos en rojo con Safranina, lo cual indica alta actividad de división celular (Fig. 17 B; 18A, 20A). Posteriormente se observa el levantamiento del meristemo en forma de c pula alargada (Fig. 17C), el cual más adelante, será más alargado, con protodermis que formar  la epidermis, y una rama de proc mbium que dará origen a los tejidos vasculares primarios del xilema y floema (Fig. 17 D).

En el nuevo bulbillo medicinal, la formación de la primera hoja envainada comienza con la aparición del primordio foliar que inicialmente adquirió forma de anillo, posteriormente la base del primordio se ensancha rodeando al meristemo apical del nuevo bulbillo (Fig. 16C, 18B), lo que nos permite observar la t nica del meristemo (Fig. 20F; 20I), el largo de la hoja envainada en el que se pudo observar la t nica del meristemo fue en rango de 2-5 mm. Enseguida el meristemo da inicio a la formación de la segunda hoja envainada, el proceso de formación fue el mismo, se observó que el engrosamiento de la base del primordio fue menor en comparación con el del primer catafilo (Fig. 17F; 18C), en este punto el meristemo apical queda envuelto en las dos hojas envainadas, cuando la segunda hoja media aproximadamente 1 mm, dio inicio la formación de la tercer hoja envainada (Fig. 18C; 18D). A medida que la base de las hojas (vaina) crecen, el pseudo tallo del bulbillo medicinal se va alargando (Figura 19A).

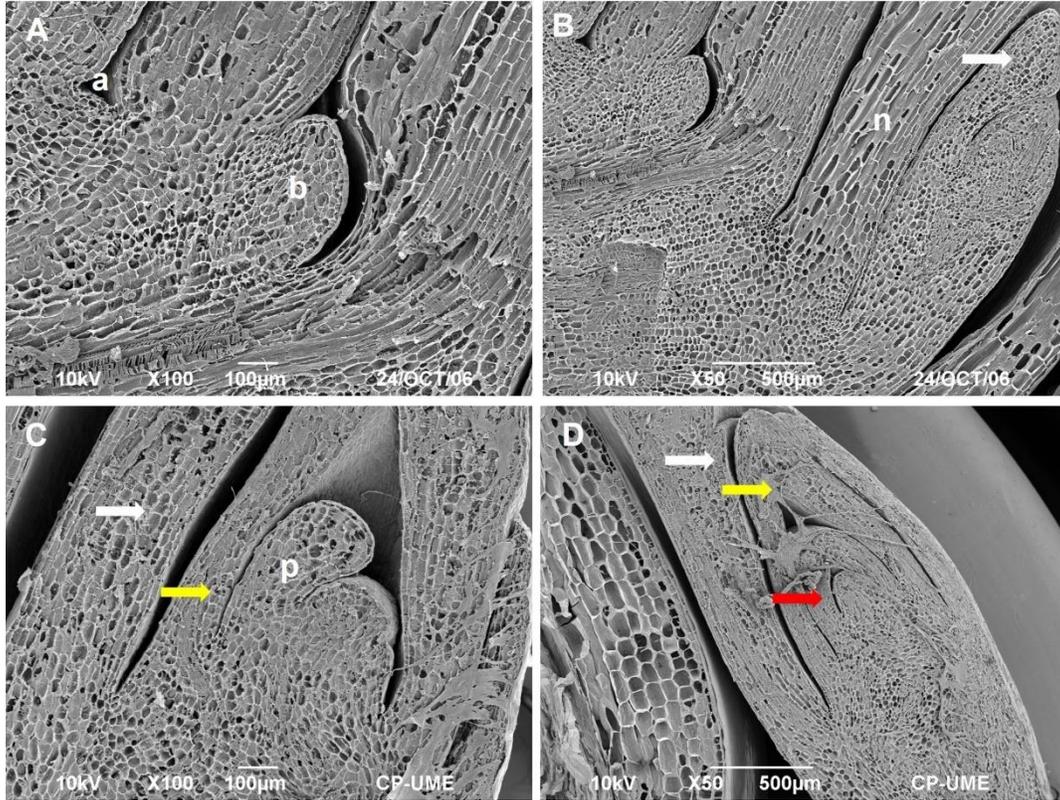
La morfología en esta etapa 4 se caracteriza por la presencia de bulbillos medicinales en diferentes estadios de crecimiento, los bulbillos se encuentran dispuestos en las axilas de manera decusada en pares y de manera alterna (Fig. 21B).



**Figura 17.** Etapa 4. Anatomía del inicio de bulbillos medicinales *Allium ampeloprasum* L., en etapa 4. La planta con 4-6 hojas verdes (nomófilos). Cortes medianos de parafina teñidos con safranina-verde fijo FCF: (A) Región central del bulbo muestra el inicio de bulbillos medicinales; (B) Promeristemo en la axila de una hoja joven. (C) Levantamiento del meristemo del bulbillo. (D) Entrada de procambium al meristemo. (E) Formación de la primera hoja envainada. (F) Inicio de la segunda hoja, y formación de la yema del bulbillo. b, primordio de bulbillo medicinal; m, meristemo apical; n, base de nomófilo; p, primordio foliar; r, primordio de raíz; s, tallo; h, hoja envainada. Flechas indican axilas.

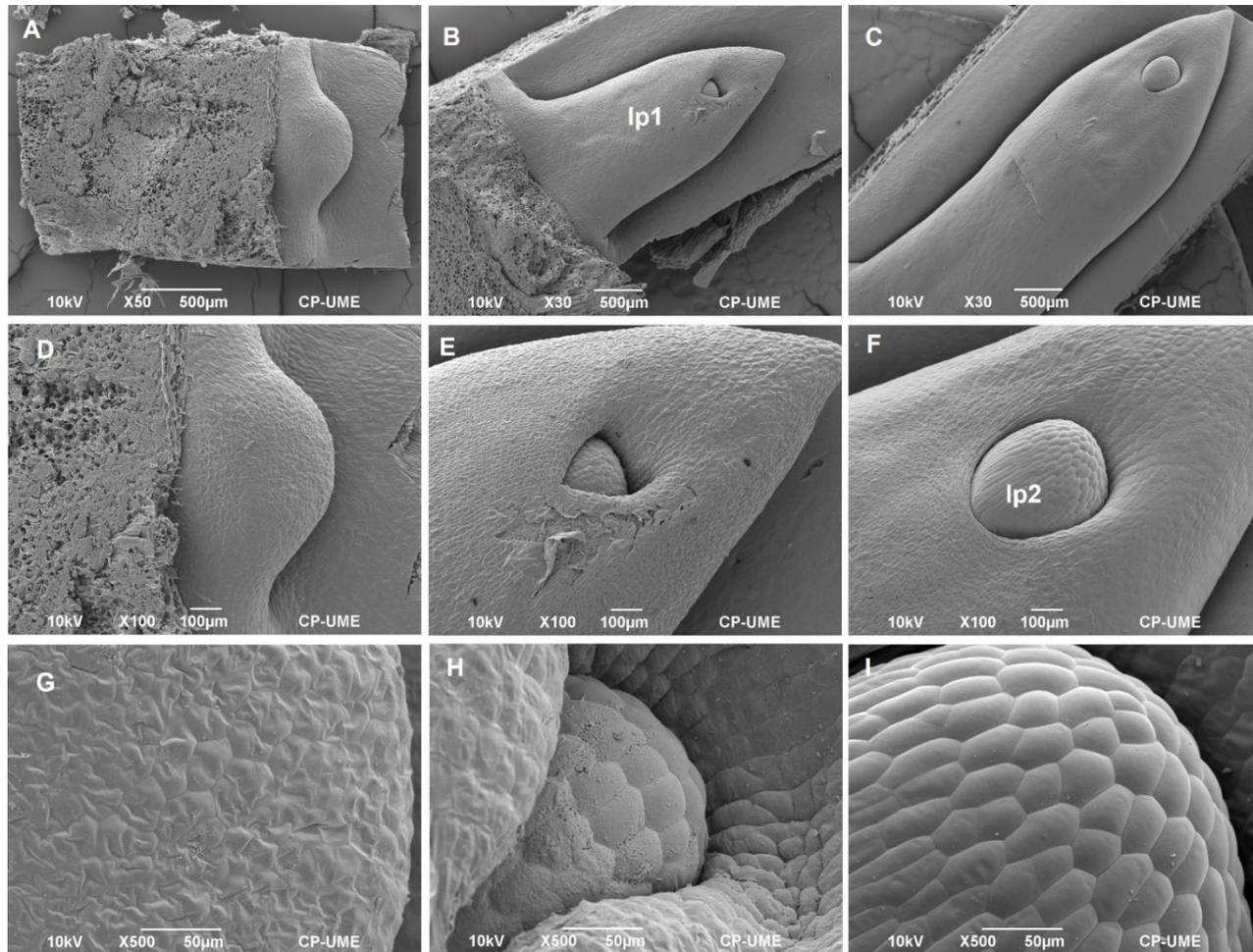


**Figura 18.** Etapa 4. Desarrollo de bulbillos de *Allium ampeloprasum* L., observado con Microscopía Electrónica de Barrido. (A) Corte mediano del bulbo principal de la planta. (B) Yema del primer bulbillo. (C) Detalle del meristemo y vainas de la yema. am, meristemo apical; bm, meristemo de bulbillo medicinal; lp1: Primordio de la primera hoja envainada; lp2 Primordio de la segunda hoja envainada., lp3, primordio de la tercera hoja envainada; m, meristemo de yema; n, base de nomófilo; s, tallo; sb, tallo del bulbillo.

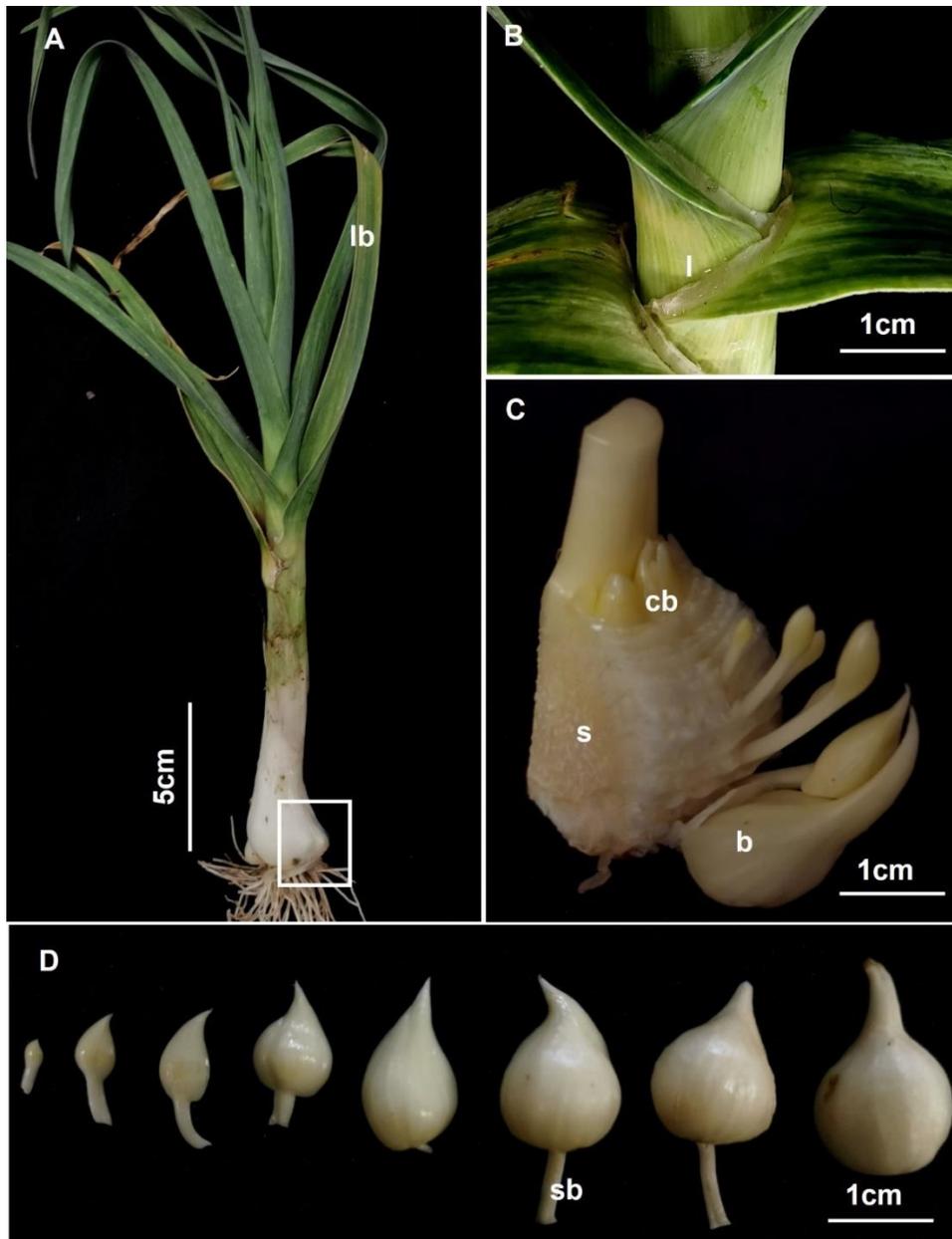


**Figura 19.** Etapa 4. Estructura de los primordios de bulbillos medicinales *Allium ampeloprasum* L., observada con Microscopía Electrónica de Barrido. (A) Meristemo en la axila de una hoja joven. (B) Formación de la primera hoja envainada (catáfilo). (C) Formación de la segunda hoja envainada (catáfilo), y formación de la yema del bulbillo. (D) Formación de la tercera hoja envainada. a, axila; m, meristemo, b, primordio de bulbillo medicinal; m, meristemo apical; n, base de nomófilo; p, primordio foliar.

Al final de esta etapa se observa que los bulbillos basales los cuales se diferenciaron y aparecieron primero, son los más viejos y han alcanzado cerca del 80% de su tamaño final, mientras que los bulbillos apicales son los más jóvenes, y de reciente aparición. Se observó que puede haber más de un bulbillo medicinal por axila. Los bulbillos desarrollan un tallito el cual se alarga en la medida que crece el bulbillo, y como resultado el bulbillo queda en posición externa (Fig. 21 B).



**Figura 20.** Etapa 4. Micromorfología externa del desarrollo de bulbillos de *Allium ampeloprasum* L., con MEB. (A, D, G) Meristemo en la axila de una hoja joven. (B, E, H) Levantamiento del meristemo del bulbillito, formación de las primeras hojas envainadas. (C, F, I) Primordio de la segunda hoja envainada. lp1, primordio de la primera hoja envainada; lp2, primordio de la segunda hoja envainada.



**Figura 21.** Etapa 4. Morfología del desarrollo de bulbillos medicinales de *Allium ampeloprasum* L.: (A) Planta completa, (B) Detalle de lígulas expuestas; (C) Base del tallo principal, sin nomófilos, que muestra la aparición espacial de bulbillos, en posición alterna y decusada en sentido acrópeta, se observa en posición superior, la reciente formación de yemas de dientes culinarios. (D) Crecimiento y tamaño relativo de los bulbillos medicinales. b, bulbillo; cb, yema de diente culinario; l, lígula; lb, lámina de la hoja. s, tallo; sb, tallo del bulbillo.

Al inicio del desarrollo de los bulbillos medicinales, estos tienen un catafilo externo de color blanco y de textura lisa que a la madurez se engrosará y lignificará. Durante el desarrollo el bulbillo tiene forma globosa, pero en la medida que se desarrolla este adopta forma plano convexa; la parte ventral (orientada hacia el tallo) es plana y la parte dorsal (opuesta) es convexa y el ápice termina en punta (Fig. 21C). Al final de esta etapa, inicia la senescencia en las hojas asociadas con las axilas de donde se formaron los bulbillos.

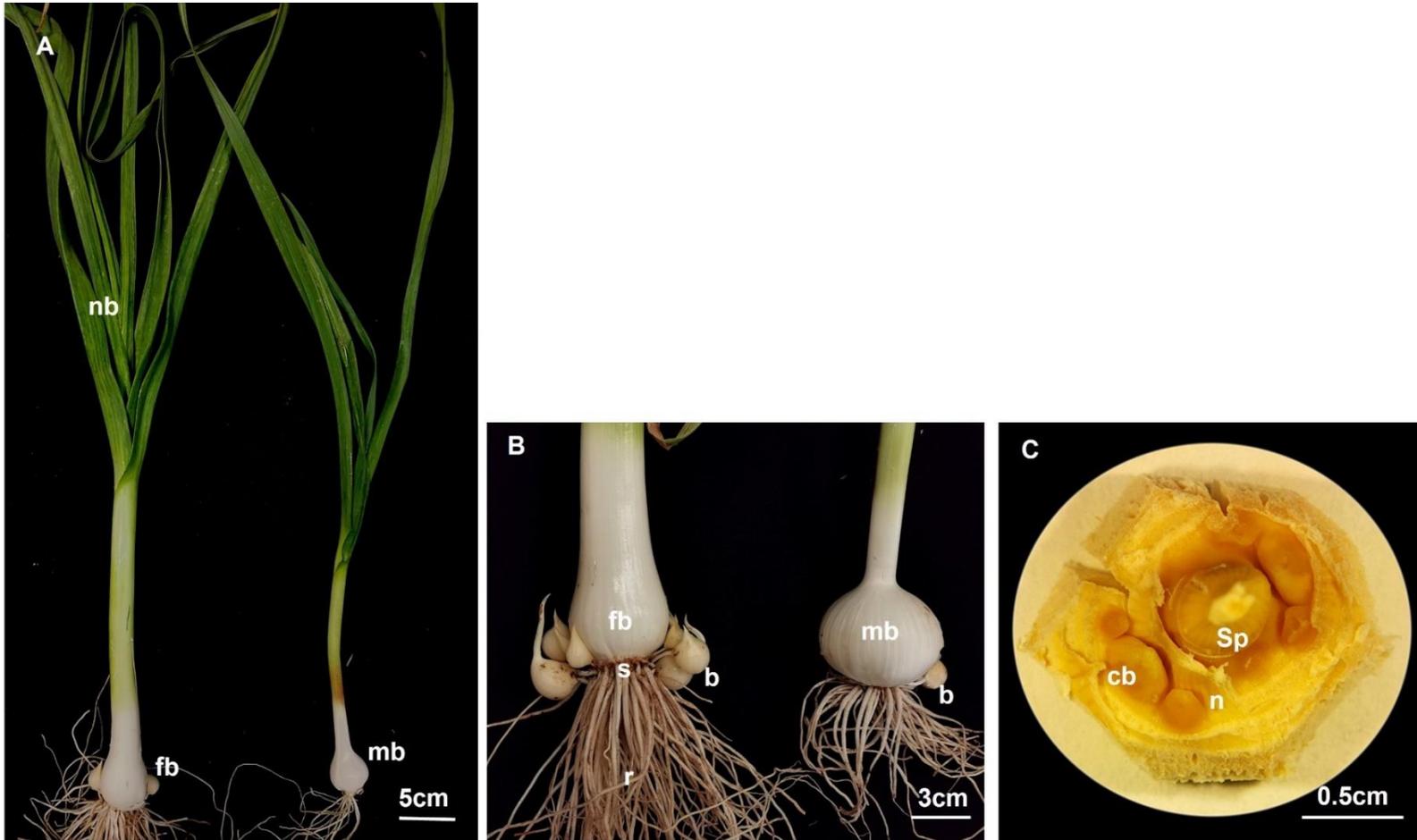
#### *Etapa 5.*

Entre el final de la etapa 4 y principios de la etapa 5 aparecen las primeras yemas que formaran los dientes de ajo culinario. Las plantas necesitan lograr un crecimiento adecuado (altura:25.00 cm; diámetro:2.90 cm) antes de que comience la formación de bulbos diente, para que el follaje pueda producir suficientes fotosintatos para la formación de bulbos grandes y con altos rendimientos (Kamenetsky *et al.*, 2004; Brewster 2008; Rohkin *et al.*, 2015).

En el bulbo de la planta hembra, antes de la formación de los dientes, la planta cesa el crecimiento vegetativo de los nomofilos, los nomofilos asociados a las axilas donde aparecen los bulbillos medicinales senecen y se secan. En posición más apical con respecto a los ajos medicinales, se inicia la formación de yemas laterales de las axilas de las vainas de los nomofilos jóvenes, que posteriormente formaran los dientes. Al término de la formación de cada diente culinario este consta de afuera hacia adentro de una hoja protectora seca (catáfilo), una hoja almacenamiento gruesa, que contiene la mayor parte de las reservas del diente y un meristemo más primordios foliares.

En el caso del bulbo de la planta macho, no se forman dientes culinarios, solo se forman nuevos nomófilos que crecen y se engrosan en la base para formar un bulbo del tipo de la cebolla (*Allium cepa* L.).

De manera simultánea los bulbillos medicinales continuaron su desarrollo hasta alcanzar el mayor tamaño, el catafilo basal adquiere tenue color amarillo y la textura continua-lisa, al término de la etapa se notó la ausencia de los nomofilos que produjeron los bulbillos medicinales aun presentes en la etapa anterior (Fig. 22 B).



**Figura 22.** Etapa 5. Morfología en fresco del inicio del llenado de bulbo principal de *Allium ampeloprasum* L.; (A) Planta completa de bulbo hembra y bulbo macho; (B) Detalle de bulbillos medicinales en planta hembra y planta macho; (C) Corte transversal de bulbo hembra que muestra la aparición de los bulbos culinarios (dientes). b, bulbillo medicinal; cb, yema de diente; fb, bulbo hembra; mb, bulbo macho; n, base de nomofilo; nb, lámina del nomófilo; ps, pseudotallo; r, raíz; s, tallo; sp, espata.

El alargamiento del escapo floral sucede después de la diferenciación del meristemo apical de vegetativo a reproductivo. El alargamiento inicial del tallo floral precede a la formación de la espata y al hinchamiento del meristemo floral (Kamenetsky y Rabinowitch, 2001).

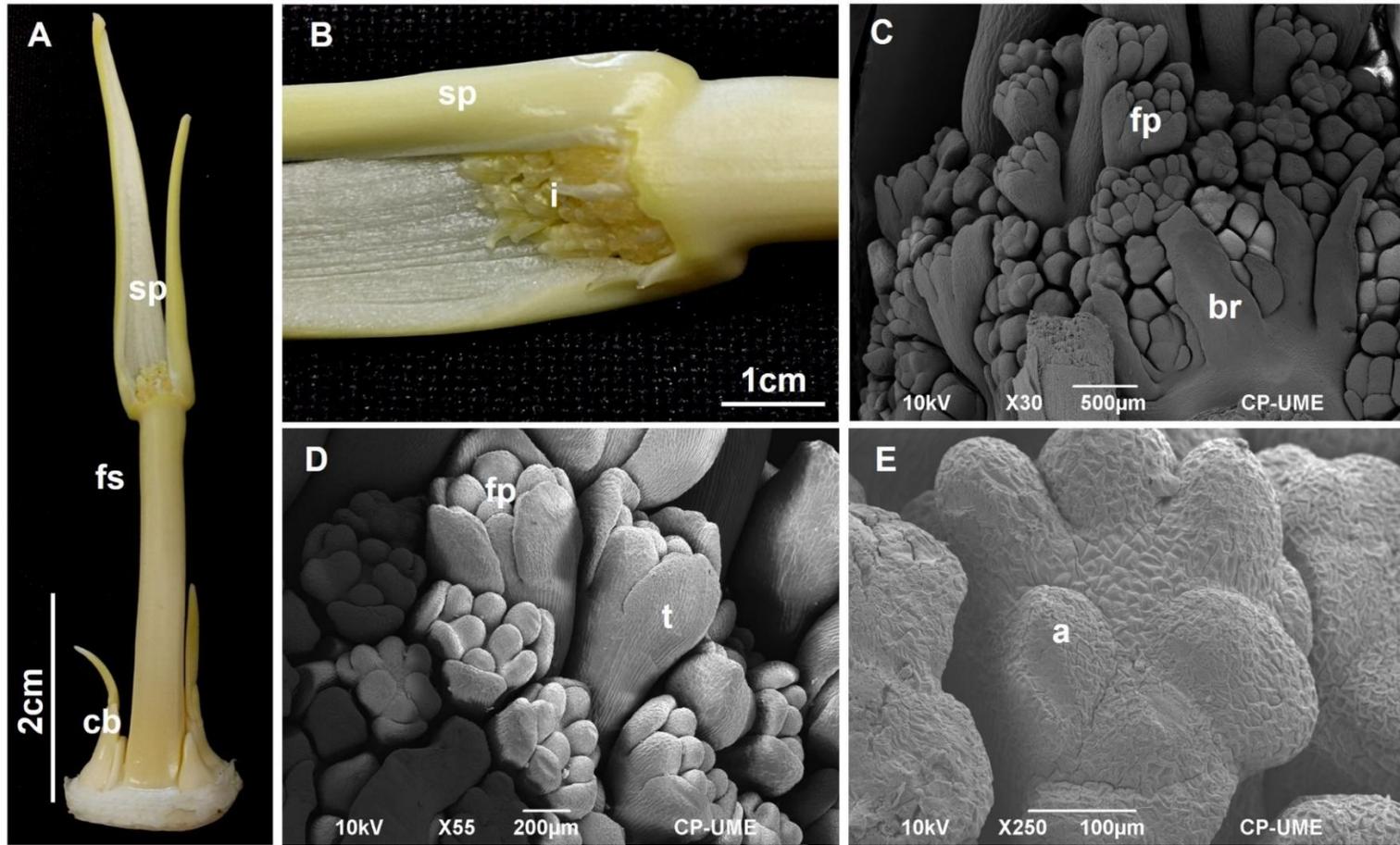
De acuerdo con los resultados de esta investigación, la planta hembra de *A. ampeloprasmum*, presenta  $7.50 \pm 1.16$  nomofilos cuando el meristemo apical de vástago cambia a reproductivo (Cuadro 5).

En esta etapa, la espata (hoja cerca de la inflorescencia) se desarrolla rápidamente y envuelve al meristemo de la inflorescencia, justo antes de que se pueda observar la diferenciación de los primordios florales individuales (Fig. 22C).

Posteriormente se observó el alargamiento del tallo de la inflorescencia (escapo) para dar inicio al engrosamiento del botón de la inflorescencia que, en este momento ya está preformado (Fig. 23A). Más tarde, el botón floral se subdivide para formar varias protuberancias, cada una de las cuales son los primordios florales individuales. Los primordios florales se desarrollan de manera desigual en orden helicoidal, como se informó para *A. sativum* L., (Kamenetsky y Rabinowitch, 2001). Al mismo tiempo, aparecen brácteas membranosas en forma de hoja en la periferia de la inflorescencia (Fig. 23C). A esto le siguen aumentos tanto en el tamaño de la inflorescencia en desarrollo, como en el número de primordios florales (Fig. 23D).

Después dio inicio la diferenciación de las flores individuales, esto se observó en los primordios de las flores más viejas, los cuales se diferencian de manera desigual.

Primero se observó la formación de los lóbulos de las anteras, específicamente 6 y simultáneamente la formación de tépalos (Fig. 23E). en la periferia de la inflorescencia se desarrollaron brácteas con forma de hoja. El crecimiento de partes florales en flores más viejas, así como la diferenciación de nuevos primordios florales que aparecieron en la base de la inflorescencia, contribuyendo al crecimiento de la inflorescencia que a su vez adquirió forma hemisférica.



**Figura 23.** Etapa 5. Formación de escapo floral de *Allium ampeloprasum* L.; (A) Bulbo sin hojas, que muestra el alargamiento temprano del escapo, en la base el inicio de la formación de los dientes; (B) Primordio de la inflorescencia. (C, D) Primordios florales de la inflorescencia observado con MEB; (E) Etapa temprana del levantamiento de las anteras en un primordio floral. a, primordio de anteras; br, brácteas; cb, yema de diente; fp, primordio floral; fs, escapo floral; i, inflorescencia; sp, espata; t, tépalos

### *Etapa 6.*

Continuando con el desarrollo de la inflorescencia descrita en la Fig. 24 se observó la morfología en fresco en etapa del levantamiento del escapo floral; en la parte aérea de la planta se observó como la espata se alarga y forma un pico largo, el cual alcanza altura promedio de 12 cm. La espata inicia de color blanquecino, luego se torna amarillenta y finalmente enverdece y la base se torna rojiza. Fig. 24B). Según Kamenetsky y Rabinowitch, (2002), se diferencia el verticilo interno y el inicio de los carpelos dado por el cubrimiento de lóbulos del perianto a los estambres.

El tallo del escapo alcanza altura promedio de  $30.43 \pm 5.15$  cm y diámetro de  $2.52 \pm 0.65$  cm.

La maduración de todos los nomófilos dado por la presencia de lígulas fue evidente en esta etapa, así mismo se observó el inicio de la marchitez de las hojas basales, lo que favoreció el llenado de las yemas de los dientes, hecho que se puede observar en la fig. 24C).

En la parte subterránea se observó que la mayoría de los bulbillos medicinales habían alcanzado su máximo tamaño, se encontraron en posición externa, debido a la degradación de los catafilos en cuyas axilas se originaron (Fig. 24A).

El espacio ocupado por los catafilos que dieron origen a los bulbillos medicinales es reemplazado por los catafilos de protección de la cabeza y los catafilos jóvenes junto con producción de dientes, estos empiezan su crecimiento y desarrollo, aportando mayor tamaño a la cabeza (Fig. 24C).

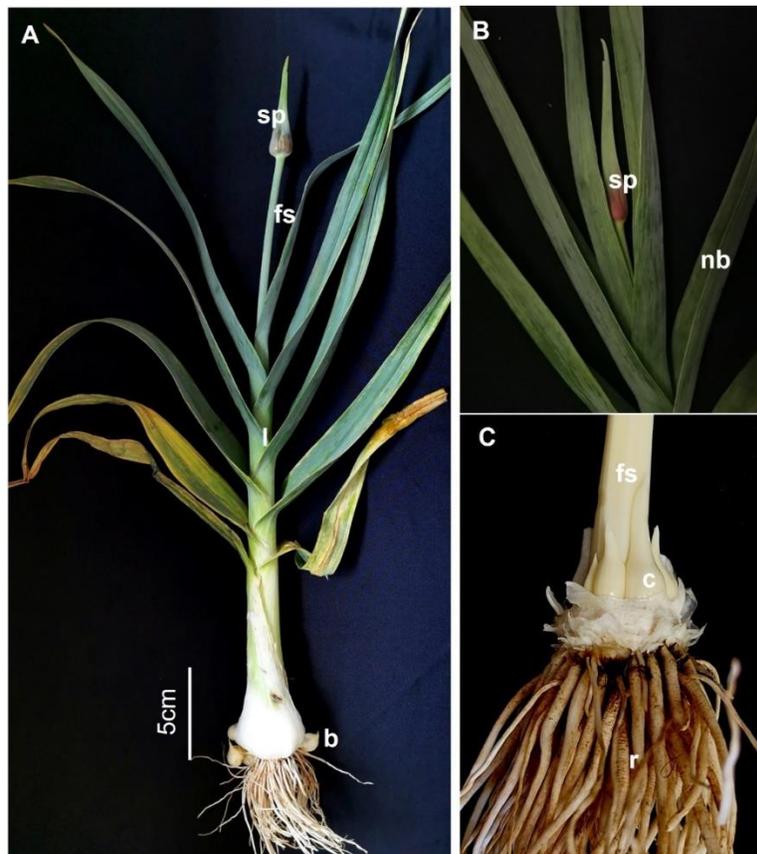
### *Etapa 7.*

El arreglo de la inflorescencia es una umbela simple, sin bulbillos. Conforme el escapo floral alcanza su máxima longitud (39.81 cm a 50.0 cm), la inflorescencia se ensancha, antes de la apertura de la espata la cual en este caso es verde, las flores presentan tépalos, tienen forma foliosa de color blanco con el nervio central verde, posteriormente, una vez que la espata se abre, poco a poco la coloración de los tépalos

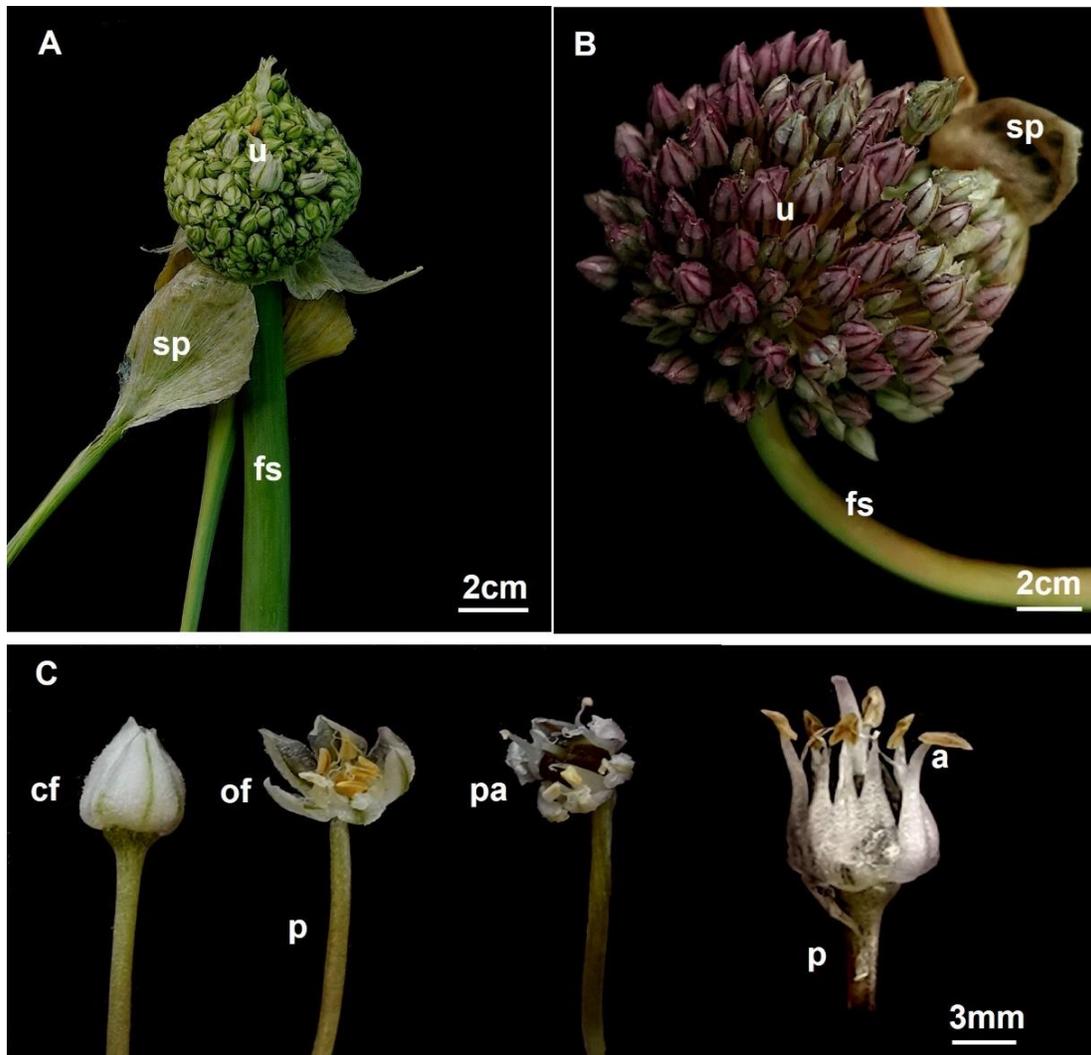
cambia de blanco a rosa tenue y el nervio central se vuelve purpura. El perianto es visible, pero pequeño, (largo de 0.5 cm y pedicelo de 1.5 – 2.0 cm). El androceo tiene 6 estambres exertos y la antera tiene inserción dorsifija (Fig. 25).

#### Etapa 8.

La maduración del bulbo en la planta ocurre desde fines de la primavera hasta principios del verano y está indicada por la senescencia y caída del 40-60% del follaje, en la parte subterránea los catáfilos sirven de protección a los bulbos y dientes por lo que es muy importante su permanencia. Un bulbo con túnicas firmes y completas demuestra la resistencia del material a la vida de anaquel (Reveles *et al.*, 2009).

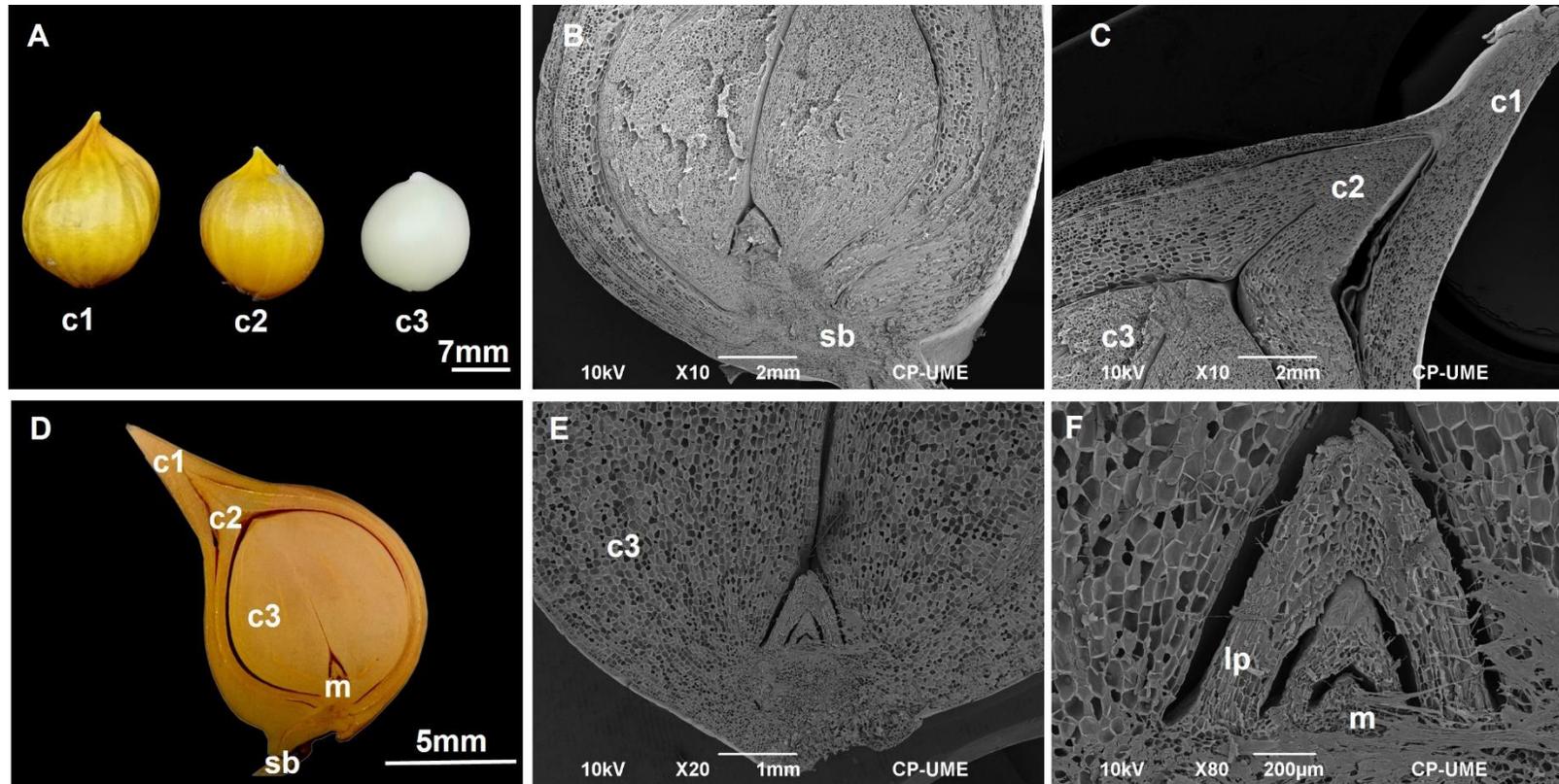


**Figura 24.** Morfología en fresco del levantamiento del escapo floral (etapa 6). (A) Planta completa de *Allium ampeloprasum* L. (B) Inicio del levantamiento del escapo floral. (C) Desarrollo simultáneo de dientes en bulbo hembra sin hojas. b, bulbilllo; c, diente; fs, tallo del escapo floral; l, lígula; lb, lámina de la hoja; r, raíz adventicia; sp, espata.



**Figura 25.** Morfología en fresco de la inflorescencia de *Allium ampeloprasum* L., en etapa 7. (A) Apariencia de la umbela cuando se encontraba dentro de la espata cerrada, en la fotografía la espata fue removida. (B) Apariencia de la umbela expuesta, después de la apertura natural de la espata. (C) Estadios de la flor. (D) Caída de sépalos, post antesis, androceo de la flor (sin tépalos). a, androceo; cf, flor cerrada; pa, post antesis; fs, escapo floral; of, flor abierta en antesis; p, pedicelo; sp, espata; u, umbela.

Al final de la etapa 8 el catafilo basal (externo) de los bulbillos medicinales aumenta su grosor y dureza, ya que se convierte en el primer catafilo de protección, éste adquiere, color amarillo ocre a café, sobre todo en los bulbillos más basales.



**Figura 26.** Morfología en fresco y micromorfología de bulbillos medicinales de *Allium ampeloprasum* L., a la cosecha (etapa 8). (B, C, E, F) Microscopía Electrónica de Barrido en cortes medianos. (A) Bulbillo completo. (B, D) Bulbillo en corte longitudinal mediano. (C) Detalle de los catafilos de protección. (E) Detalle de catafilo de reserva. (F) Detalle de meristemo apical y primordios de vainas foliares. c1, primer catafilo de protección; c2, segundo catafilo de protección; c3: Tercer catafilo y único de reserva; s, tallo; m: meristemo apical; lp, primordio de vaina foliar.

El segundo catafilo (interno) adquiere coloración similar, aunque con tonos más fuertes que el anterior, es menos grueso, pero igualmente duro, la parte apical o punta, es menos aguda que el del primer catafilo. El tercer catafilo, el más interno y único catáfilo de reserva, es grueso, liso y de color blanco.

### 5.3 Histoquímica.

Las estructuras de las células vegetales son translúcidas a menos que estén teñidas. La histoquímica permite la identificación y localización, a nivel celular, de biomoléculas y orgánulos en diferentes tipos de células y tejidos, basándose en el uso de reacciones de tinción e imagen específicas (Yadav *et al.*, 2021).

#### *Lípidos*

Los lípidos vegetales son diversos y esenciales para la integridad de las células y los orgánulos al actuar como una barrera hidrofóbica para la membrana. Además, los lípidos se almacenan en forma de energía química en las semillas, a su vez, actúan como molécula de señal para regular el metabolismo celular (Kim, 2020). El rojo aceite O es un colorante lipófilo que, debido a su comportamiento de solución, difunde hacia los lípidos del tejido, es una tinción histoquímica general para lípidos hidrófobos, ácidos grasos y grasas neutras (Clark, 1981; Akin *et al.*, 2004). En la fig. 27A, se observa corte transversal de un diente de *A. ampeloprasum*, señalando pequeñas gotas de lípidos en color rojo, dispersas dentro del citoplasma de células de parénquima, (células isodiamétricas, vacuoladas), de mayor tamaño en comparación con los esferosomas observados en el corte longitudinal de bulbillo medicinal (Fig. 27B). Los lípidos representan menos del 0.5% del tejido vegetal crudo, en particular, la cebolla contiene  $0.15 \pm 0.6\%$ , ajo  $0.42 \pm 0.11\%$ , puerro  $0.25 \pm 0.9\%$  y ajo elefante  $0.18\%$ . Los principales ácidos grasos presentes en un contenido superior al 2.5% son: ácido linoleico, palmítico, linolénico, oleico (en ajo, cebolla y puerro), y el ácido láctico (en ajo elefante) con el 53% del total de ácidos grasos (Tsiaganis *et al.*, 2005; García *et al.*, 2014).

### *Proteínas*

Las proteínas vegetales (clasificadas como “simples” (Obsborne,1924)), satisfacen las necesidades de la plántula emergente en términos de nutrición y crecimiento, a través de sus funciones enzimáticas, estructurales, funcionales y de almacenamiento (fotosíntesis, biosíntesis, transporte, inmunidad, etc.) (Rasheed *et. al.*, 2020). Azul negro de naftol tiñe las proteínas en azul. En las figuras 27C, 27D se observan de cortes transversales de dientes y bulbillos medicinales de *A. ampeloprasum*, señalando cuerpos proteicos redondos, de mayor tamaño en células del tejido de dientes.

### *Polisacáridos insolubles.*

Reacción PAS (Ácido tinción: reactivo de Schiff) Este método se basa en la reacción del ácido tinción con carbohidratos, formando grupos carbonilo revelados por el reactivo de Schiff (Soukup, 2013). Los carbohidratos se tiñen de magenta McManus, 1948; Farid, 2019. En la figura 27E, 27F, se observan en corte longitudinal de diente y bulbillos medicinal, células de parénquima con pigmentación magenta en las paredes celulares, resultado de la pigmentación de la celulosa que es el principal componente estructural de la pared celular vegetal.

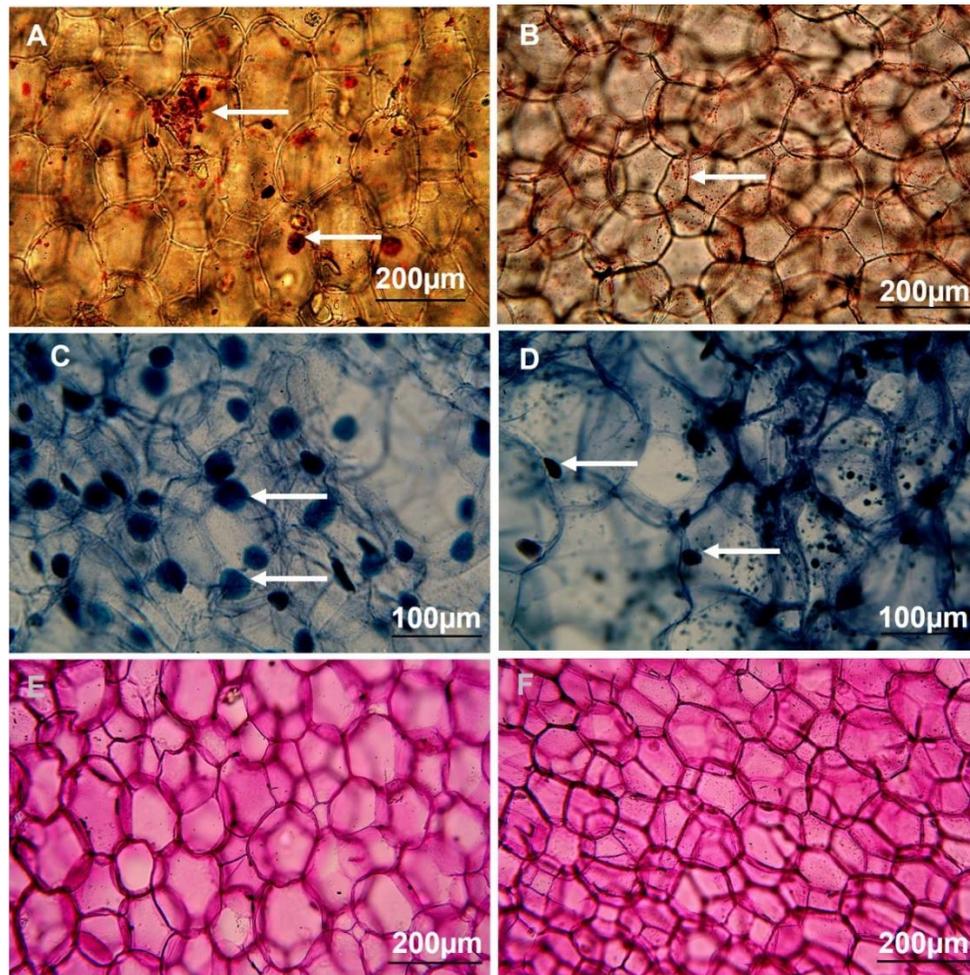
### *Almidón.*

El almidón es un glucano insoluble compuesto por dos polímeros de glucosa, amilopectina y amilosa. Como principal carbohidrato de almacenamiento, el almidón juega un papel importante durante el ciclo de vida de la planta (Zeeman *et al.*, 2010)

Johansen,1940; Farid, 2019, reportan que la tinción con reactivo de Lugol genera una reacción que resalta los granos de almidón en azul oscuro a negro, a su vez casi todas las demás estructuras se tiñen de amarillo, pero este color no tiene un significado específico. La tinción dio negativo a la presencia de almidón, tanto en dientes como en bulbillos medicinales de *A. ampeloprasum*, esto concuerda con lo reportado para *Allium ampeloprasum* por Khorasani, (2018) y Ranwala y William (2008) quienes reportan la ausencia de almidón para *Allium spp.*

## Taninos.

Los taninos son compuestos que contienen diversos grupos hidroxilo fenólicos que les permiten formar enlaces cruzados estables entre proteínas y otras macromoléculas. Se subdividen en: taninos hidrolizables y condensados. El método de vainillina-HCl estima el contenido de proantocianidinas en las células vegetales, lo que da como resultado un color rojo de la prueba en presencia de catequina o proantocianidinas (Mace y Howell, 1974). En la fig. 27I-27J, no se observó presencia de taninos.

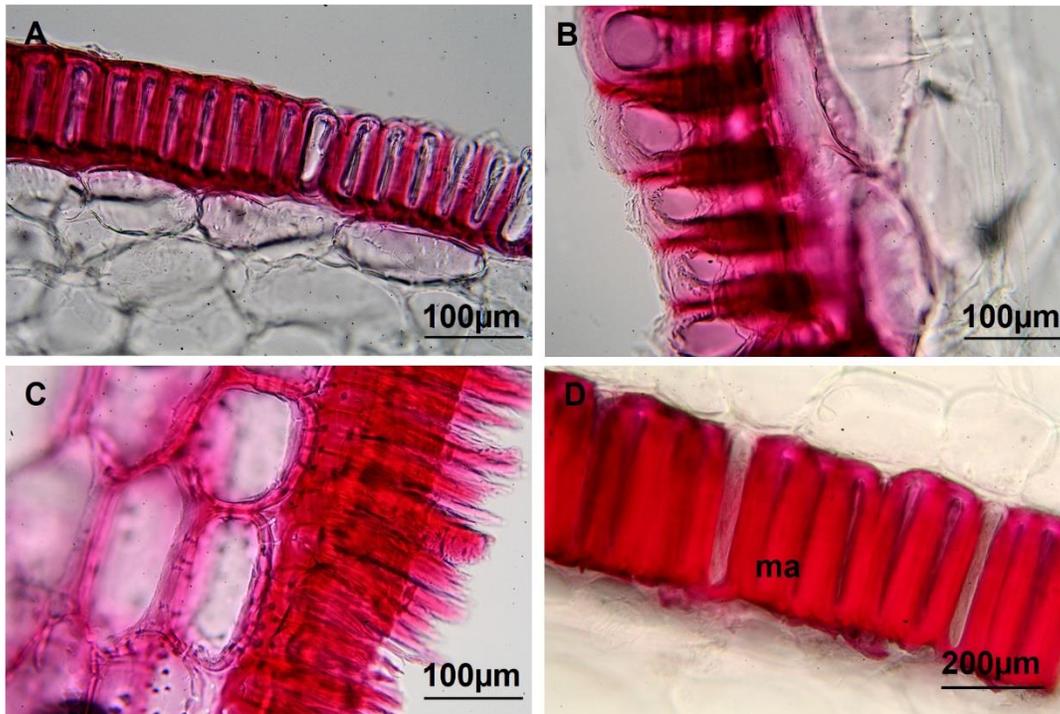


**Figura 27.** Histoquímica en dientes y bulbillos de *Allium ampeloprasum* L. Microscopia fotónica. (A, C, E) Bulbo diente; (B, D, F) Bulbillo medicinal. (A,B) Detección específica de lípidos, tinción Rojo oleoso. (C, D) Detección específica de proteínas, tinción Azul negro de Naftol. (E, F) Detección específica de polisacáridos insolubles, tinción PAS (Ácido periódico-Schiff).

## *Lignina*

La lignina es un heteropolímero que forma parte de la pared celular del tejido vascular de las plantas y provee rigidez estructural, así como resistencia a la tensión y presión hídrica, además, confiere soporte a células especializadas en sostén y almacenamiento (Maceda *et al.*, 2022), con la tinción con floroglucinol (Wiesner, 1879), la pared celular se volverá roja temporalmente (Liljegren, 2010). En la fig. 28A. se observa células de la epidermis, con paredes engrosadas, tenidas en rojo cereza, al igual que las células del colénquima, en tejido de dientes.

En el C1 y C2 (fig. 28B y 28C) de los bulbillos medicinales se observan células de la epidermis formada por macroesclereidas y esclereidas sub epidérmicas lignificadas. Los monómeros de lignina pueden difundirse libremente en el espacio extracelular, pero solo se polimerizan en las paredes celulares secundarias (Liu *et al.*, 2018) Con base en las observaciones a lo largo de esta investigación, relacionamos la lignificación de los catafilos con el cambio de coloración observado durante las últimas dos etapas de cultivo (blanco a amarillo), lo que indica el momento de su cosecha



**Figura 28.** Anatomía de los catáfilos protectores de los bulbos dientes y bulbillos medicinales de *Allium ampeloprasum* L. Tinción de lignina con floroglucinol-HCl: (A) Epidermis externa del catafilo de protección en el bulbo diente; (B) Epidermis externa del catafilo externo de protección del bulbillo medicinal (C1). C. Catafilo de protección interno (C2) del bulbillo medicinal. C. Detalle de la epidermis de la imagen C. ma, macroesclereidas de la epidermis, es, esclereidas subepidérmicas.

## VI. CONCLUSIONES

El ciclo de cultivo de ajo (*A. ampeloprasum* L.) en la región de Tetela de Ocampo, requiere 9 meses. La planta forma tres bulbos, lo que le da un valor agregado al cultivo de ajo elefante en comparación al *A. sativum*, que solo produce cabezas de dientes pequeños y de menor peso.

Al final de su desarrollo, los bulbos hembras presentan mayor tamaño y producción de BM.

La formación de los primeros bulbillos medicinales inicia en las axilas de nomofilos basales cuando la planta tiene 4-6 nomofilos maduros con lígula expuesta y el catafilo de reserva del bulbo semilla se ha secado. Las yemas aparecen en pares, decusadas y en sentido acrópeto. Este evento precede a la formación de los dientes en la planta hembra y al engrosamiento de la base de los nomófilos en la planta macho.

Las pruebas histoquímicas mostraron ausencia de taninos y para el caso de almidón se confirmó la ausencia en el tejido de reserva de bulbos culinarios y bulbillos medicinales con dos técnicas (Lugol y APS). Se sugieren estudios más detallados con relación a la histolocalización de compuestos medicinales en BM y BC.

La tinción positiva de lignina en los catafilos de protección del bulbillo medicinal evidenció la presencia de esclerénquima el cual forma una envoltura dura e impermeable, que puede estar relacionada con la vida de anaquel, de hasta dos años.

Se propone una secuencia de etapas fenológicas asociadas a eventos anatómicos internos entre ellos la formación de bulbillos medicinales y posteriormente el inicio del llenado del bulbo, con descripción asociada al tiempo en el ciclo de cultivo y a notables eventos en la parte aérea de la planta.

Este es el primer reporte sobre la descripción morfo-anatómica de la diferenciación de los bulbillos medicinales que relaciona los eventos de diferenciación de las estructuras internas con la fenología externa en *A. ampeloprasum*.

## VII. LITERATURA CITADA

- Ascrizzi R. y Flamini G. 2020. Leek or Garlic? A Chemical Evaluation of Elephant Garlic Volatiles. *Molecules* 25(9): 2082. 10.3390/moléculas25092082
- Base de Datos Estadísticos Corporativos de la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAOSTAT). 2020. Cultivos y productos de ganadería. Obtenido de: <https://www.fao.org/faostat/es/#data/QCL>.
- Bruna V., A. 2001. Ajos. 2. Técnicas de desinfección de semillas. Santiago: Informativo, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, La Platina No. 12. Obtenido de: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/4927>
- Caputo L., Amato G., Fratianni F., Coppola Raff., Candido V., De Feo V. Nazzaro F. 2020. Chemical Characterization and Antibiofilm Activities of Bulbs and Leaves of Two Aglione (*Allium ampeloprasum* var. holmense Asch. et Graebn.) Landraces Grown in Southern Italy. *Molecules* 25(23): 5486. Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25235486>
- Ceccantia C., Rocchettib G., Lucinib L., Giubertib G., Landiac M., Biagiottid S., Guidi L. Comparative phytochemical profile of the elephant garlic (*Allium ampeloprasum* var. holmense) and the common garlic (*Allium sativum*) from the Val di Chiana area (Tuscany, Italy) before and after in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry* 338: 128011. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128011>
- Celia de la Cuadra. 2022. Germinación, latencia y dormición de las semillas. Dormición en las avenas locas. Ministerio de agricultura, pesca y alimentación 3(92): 1-24. Obtenido de: [https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd\\_1992\\_03.pdf](https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1992_03.pdf)
- Contribución al conocimiento para la producción de ajo elefante (*Allium ampeloprasum* complex), en Mendoza, Argentina. *Horticultura Argentina* 28(65): 63-86
- D.E Akin, L.L Rigsby, W.H Morrison. 2004. Oil Red as a histochemical stain for natural fibers and plant cuticle. *Industrial Crops and Products* 19(2):119-124. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2003.08.002>
- Domínguez M. C. y Paz P. F. 2018. Spectral patterns of the phenology of vegetative and reproductive development of huizache trees (*Acacia farnesiana* (L.) Willd.). *Terra Latinoamericana* 36 (4): 396-409. Doi: <https://doi.org/10.28940/terra.v36i4.417>
- Farid A. B. y Walaa S. A. 2019. Plant Histochemistry: A Versatile and Indispensible Tool in Localization of Gene Expression, Enzymes, Cytokines, Secondary Metabolites and Detection of Plants Infection and Pollution. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences* 3 (7): 88-100. Doi: 10.31080/ASPS.2019.03.0318.
- García A. C. 1998. El ajo. Cultivo y aprovechamiento. Mundi-prensa (205p).

- García H. P., Morales P., Fernández R.V., Sánchez M. M.C., Cámara M., Carvalho A.M., Ferreira M. I.C.F.R., Pardo-de-Santayana, Molina M., Tardío J. 2014. Nutrients, phytochemicals and antioxidant activity in wild populations of *Allium ampeloprasum* L., a valuable underutilized vegetable. *Food Research International* 62: 272-279. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.004>.
- Guenauoui C., Mang S., Figliuolo G., Neffati M. 2013. Diversity in *Allium ampeloprasum*: from small and wild to large and cultivated. *Genetic Resources and Crop Evolution* 60: 97–114
- Guíñez S. Abdón. 2010. Manejo fitosanitario del cultivo de ajos. Nematodos en el cultivo de ajo. Santiago, Chile: Instituto de Investigación Agropecuaria No. 213. Obtenido de: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/7343>.
- Harding, S. 2004. Inflorescence development in *Allium ampeloprasum* var. *babingtonii* (Babington's leek). Cardiff University. Doi: <https://ethos.bl.uk/OrderDetails.do?did=1&uin=uk.b...>
- Huang Z. y Ren J. 2013. Antibacterial Activity of Elephant Garlic and Its Effect against U2OS Human Osteosarcoma Cells. *Iran Journal Basic Medical Science*. 16 (10): 1088–1094. Doi: PMC3874095
- INFED. 2021. Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México. Obtenido de: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM21puebla/municipios/21172a.html>
- Kamenetsky, R. and Rabinowitch, H.D. 2001. Floral Development in Bolting Garlic. *Sexual Plant Reproduction* 4; 235-241. <https://doi.org/10.1007/s004970000061>
- Khorasani M., Mehrvarz Sh S. 2018. Bulb tunic anatomy and its taxonomic implication in *Allium* L. (Amaryllidaceae: Alliioideae). *Plant Biosystem-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* 152 (6): 1311-1328. Doi: <https://doi.org/10.1080/11263504.2018.1448013>
- Kim HU. 2020. Lipid Metabolism in Plants. *Plants* 9(7): 871. Doi: 10.3390/plants9070871
- kim sunyoung, dan-bi kim, wenjie jin, Parque Junghyuck, Won Jin Yoon, yunyeol lee, kim soyoung, Sanghee Lee, kim sungsoo, Ok-Hwan Lee, dongbin-shin, Miyoung yoo. 2018. Comparative studies of bioactive organosulphur compounds and antioxidant activities in garlic (*Allium sativum* L.), elephant garlic (*Allium ampeloprasum* L.) and onion (*Allium cepa* L.). *Formerly Natural Product Letters*. 32(10): 1193-1197. 10.1080/14786419.2017.1323211
- Lanzavechia S. 2007. Caracterización fisiológica y agronómica de Ajo elefante” (*Allium ampeloprasum* var *Ampeloprasum*), en San Carlos, Mendoza, Argentina. INTA 083. Obtenido de: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-doc\\_083\\_caracterizacin\\_fenolgica\\_y\\_agronmica\\_de\\_alliu.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-doc_083_caracterizacin_fenolgica_y_agronmica_de_alliu.pdf)

- Lanzavechia S. 2009. Contribución al conocimiento para la producción de ajo elefante (*Allium ampeloprasum* complex), en Mendoza, Argentina. *Horticultura Argentina* 28(65).
- Larraín S. P. 2010. Manejo fitosanitario del cultivo de ajos- Plagas en el cultivo de ajos. Santiago, Chile: INIA. No. 213. Obtenido de: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/7343>
- Liljegren Sarah. 2010. Phloroglucinol Stain for Lignin. *Cold Spring Harb Protocols* 5 (1). Doi: 10.1101/pdb.prot4954
- Liu Q., Luo L., Zheng L. 2018. Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants. *Int J Mol Sci* 19(2): 335. Doi: 10.3390/ijms19020335
- Loppi S., Fedeli R., Canali G., Guarnieri M., Biagiotti S. y Vannini A. 2021. Comparison of the Mineral and Nutraceutical Profiles of Elephant Garlic (*Allium ampeloprasum* L.) Grown in Organic and Conventional Fields of Valdichiana, a Traditional Cultivation Area of Tuscany, Italy. *Biology* 10(10): 1058. <https://doi.org/10.3390/biology10101058>
- Mace M.E. y Howell C.R. 1974. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. *Canadian Journal Botany*. 52 (11): Doi: 2423-2426. <http://dx.doi.org/10.1139/b74-314>
- Maceda A., Soto H.M., Peña V. C.B., Trejo C., Terrazas T. 2021. Lignina: composición, síntesis y evolución. *Madera y bosques*, 27(2). Doi: <https://doi.org/10.21829/myb.2021.2722137>
- Macías V. L.M., Maciel P.L.H., Cruz V.A., Galindo R.M.A. y Domínguez L.R. 2021. Orión: nueva variedad de ajo para la zona centro norte de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 12(1):163-170. Doi: <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i1.2206>
- Meerow A.W., Snijman D.A. 1998. Amaryllidaceae. In: Kubitzki K. (eds) *Flowering Plants Monocotyledons. The Families and Genera of Vascular Plants* 3: 83-110. Doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-03533-7\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-662-03533-7_11)
- Municipium. 2022. Atlas de riesgos, Tetela de Ocampo Puebla. Obtenido de: <http://www.municipium.mx/atlasderiesgos/tetela/mapas.php>
- Najda. G., Błaszczuk L., Winiarczyk K., Dyduch J., Tchórzewska D. 2016. Comparative studies of nutritional and health-enhancing properties in the “garlic-like” plant *Allium ampeloprasum* var. *ampeloprasum* (GHG-L) and *A. sativum*. *Scientia Horticulturae* 201: 247-255. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.01.044>
- Osborne T.B. 1924. *The Vegetable Proteins*. 2ª ed. Longmans, Green and Co. London, UK: pp. 1–154.

- Pertierra R., Peña G., y Muñoz B. C. 2020. Pauta de Chequeo Ajo chilote. Obtenido de: <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/4016/Informativo%20INIA%20N%c2%b0%20244?sequence=1&isAllowed=y>
- Pío Font Quer. 1953. Diccionario de botánica.
- Rabinowitch H. D., Brewster J. L. 1990. Onions and Allied Crops. Botany, Physiology, and Genetics. Tylor & Francis Group; 113-135.
- Ranwala A.P., Miller W.B. 2008. Analysis of nonstructural carbohydrates in storage organs of 30 ornamental geophytes by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *New Phytologist* 180(2):421-433. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02585.x>
- Rasheed F. Markgren J., Hedenqvist M., Johansson E. 2020. Modeling to Understand Plant Protein Structure-Function Relationships: Implications for Seed Storage Proteins. *Molecules*. 25 (4): 873. Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25040873>
- Reveles H. M., Velásquez V. R., Bravo L. A. G. 2009. Tecnología para cultivar ajo en Zacatecas. INIFIAP No. 11. 51p.
- Reveles H. M., Velásquez V.R., y Cid R.J.A. 2017. Barretero: nueva variedad de ajo jaspeado para Zacatecas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8(6):1455-1462
- Roberts I. N., Caputo C., Criado M.V., Funk C. 2012. Senescence-associated proteases in plants. *Physiologia Plantarum* 145(1): 130-139. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01574.x>
- Rohkin S. S., Gillett D., Zemach H., Kimhi S., Forer I., Zutahy Y., Tam Y., Teper-Bamnlker P., Kamenetsky R., y Eshel D. 2015. Storage temperature controls the timing of garlic bulb formation via shoot apical meristem termination. *Plant* 242: 951–962. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2334-0>
- Royal Botanic Gardens Kew. 2022. Obtenido de: <https://powo.science.kew.org/taxon/332079-2#source-KBD>
- SAGARPA. 2017. Aumenta producción de ajo “Hecho en México” 28.9 por ciento en 201. Obtenido de: <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/aumenta-produccion-de-ajo-hecho-en-mexico-28-9-por-ciento-en-201#:~:text=La%20SAGARPA%20explic%C3%B3%20que%20este,ciento%20de%20la%20producci%C3%B3n%20nacional.>
- Sepúlveda R. P. 2010. Manejo fitosanitario del cultivo de ajos. Santiago, Chile. INIA 213. Obtenido de: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/7343>
- Soukup, A. (2013). Selected Simple Methods of Plant Cell Wall Histochemistry and Staining for Light Microscopy. *Plant Cell Morphogenesis* 1080: 25–40
- The Plant List. 2013. Version 1.1. Obtenido de: <http://www.theplantlist.org/>

- Thet Zin. 2017. Morphological and Anatomical Studies on *Allium sativum* L.cv. Yatsauk hmwar phyu. Universities Research Journal 9(2).
- Tiwari U., Adams S. J., Begum N., Krishnamurthy K. V., Ravikumar K., Padma V. 2014. Pharmacognostic Studies on Two Himalayan Species of Traditional Medicinal Value: *Allium wallichii* and *Allium stracheyi*. Notulae Scientia Biologicae, 6(2), 149-154. Doi: <https://doi.org/10.15835/nsb629308>
- Tropicos.org. 2022. Missouri Botanical Garden. Obtenido de: <https://tropicos.org/name/18400005>
- Trumbo, P., Schlicker, S., Yates, A. A., & Poos, M. (2002). Dietary reference intakes for energy carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. Journal of the American Dietetic Association 102(11): 1621–1630
- Tsiaganis M.C., Laskari K., Melissari E. 2005. Fatty acid composition of *Allium* species lipids. Journal of Food Composition and Analysis 19 (2006): 620–627. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.06.003>
- WFO (2022): *Allium ampeloprasum* L. Obtenido de: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000755607>. Consultado 14 Mar 2022.
- Wiesner J (1878) Nota über das Verhalten des Phloroglucins und einiger verwandter Körper zur verholzten Zellmembrane. Sitzungsberichte der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften 77:60–66.
- Withers P., y Cooper C. E. 2019. 2ª ed. Dormancy. Encyclopedia of Ecology 3: 309-314
- Wolf Salomon. 2004. Efecto de la fecha de plantación en dos tipos de propágulos de ajo chilote (*Allium ampeloprasum* L. var. *ampeloprasum* Millán). Universidad Austral de Chile. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2004/faw855e/pdf/faw855e-TH.3.pdf>
- Woo H.R., Kim H.J., Lim P.O., Nam H.G. 2019. Leaf Senescence: Systems and Dynamics Aspects. Annual Review of Plant Biology 70:347-376. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-095859>
- Yadav V., Arif N., Singh V. P., Guerrero G., Berni R., Shinde S., Raturi G., Deshmukh R., Sandalio L. M., Chauhan D. K., Tripathi D. K. 2021. Histochemical Techniques in Plant Science: More Than Meets the Eye. Plant and Cell Physiology 62(10):1509–1527.
- Zeeman S. C., Kossmann J., Smith A.M. 2010. Starch: Its Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants. Annual Review of Plant Biology 61:209-234. Doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112301

## ANEXOS

Análisis estadístico del largo de bulbos de *Allium ampeloprasum* L.

<b>Análisis de la varianza</b>					
Variable	N	R <sup>2</sup>			CV
Largo (cm)	215	0.70	R <sup>2</sup> Aj	0.69	20.03
<b>Análisis de la Varianza (SC tipo III)</b>					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	320.60	2	160.30	243.47	<0.0001
Tipo de bulbo	320.60	2	160.30	243.47	<0.0001
Error	139.58	212	0.66		
Total	460.18	214			

Análisis de la varianza, variable "Diámetro", en bulbos de *Allium ampeloprasum* L.

<b>Análisis de la varianza</b>					
Variable	N	R <sup>2</sup>			CV
Diámetro (cm)	215	0.84	R <sup>2</sup> Aj	0.84	20.41
<b>Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)</b>					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	873.35	2	436.68	243.47	<0.0001
Tipo de bulbo	873.35	2	436.68	243.47	<0.0001
Error	163.34	212	0.77		
Total	1036.69	214			

Análisis de la varianza, variable "Peso", en bulbos de *Allium ampeloprasum* L.

<b>Análisis de la varianza</b>					
Variable	N	R <sup>2</sup>			CV
Peso (g)	215	0.56	R <sup>2</sup> Aj	0.56	85.47
<b>Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)</b>					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	473099.83	2	236549.92	135.25	<0.0001
Tipo de bulbo	473099.83	2	236549.92	135.25	<0.0001
Error	370782.21	212	1748.97		
Total	843882.04	214			

Análisis de la varianza, variable "Producción de bulbillos medicinales", en bulbos machos y hembras de *Allium ampeloprasum* L.

<b>Análisis de la varianza</b>					
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV	
Numero de bulbillos	90	0.62	0.62	40.27	
<b>Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)</b>					
F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor
Modelo	1013.38	1	1013.38	146.43	<0.0001
Tipo de bulbo	1013.38	1	1013.38	146.43	<0.0001
Error	609.02 88	212	6.92		
Total	1622.40 89	214			