

Análisis citológico de una variante genética somática de ajo (*Allium sativum* L.) tipo rosado

Ordóñez, A.; L E. Torres, M. G. Hidalgo y J. O. Muñoz

RESUMEN

Se analizó citológica y fenotípicamente el clon 118.15 de ajo, obtenido del tipo comercial "rosado" mediante la aplicación de técnicas de multiplicación *in vitro*, que en el transcurso de su desarrollo mostró características morfológicas diferenciales con respecto a este tipo comercial. Se llevó a cabo el recuento cromosómico y la observación de irregularidades durante la mitosis; se construyeron además los respectivos cariotipos, que fueron clasificados según las categorías de asimetría de Stebbins. Las variables fenotípicas analizadas fueron: altura de planta (cm), diámetro del pseudotallo (cm), ancho de la hoja (cm) y largo de la tercera hoja (cm). A cosecha se determinó: peso promedio del bulbo (g), peso promedio de los bulbillos (g) y número de bulbillos por bulbo. El análisis citológico del clon 118.15 permitió detectar irregularidades cromosómicas sin definir un cariotipo distinto. Sin embargo, las diferencias fenotípicas observadas para algunos caracteres morfológicos indicarían la existencia de un nuevo clon.

Palabras clave: *Allium sativum*, cultivo *in vitro*, aberraciones cromosómicas, número cromosómico, cariotipo.

Ordóñez, A.; L. E. Torres, M. G. Hidalgo y J. O. Muñoz, 2002. Cytological and phenotypic analysis of one somatic genetic variant of garlic (*Allium sativum* L.) pink type. Agriscientia XIX: 37-43

SUMMARY

In this study, the cytological and phenotypical characteristics of the 118.15 garlic clone belonging to the "rosado" commercial type were analyzed. This clone was obtained by techniques of multiplication *in vitro* and it showed morphological differences with respect to the original commercial type. Chromosome countings were carried out and mitotic irregularities were observed. The karyotypes belonging to the 118.15 clone and to the control clone were also described. For the phenotypic analysis, the traits: plant height, pseudo-culm diameter, leaf width and third leaf length were measured. At harvest, average bulb weight, average

bulb weight and number of bulblets per bulb were determined. From the cytological analysis it was possible to detect the occurrence of mitotic irregularities which did not define a different karyotype. However, differences observed for some of the analyzed phenotypical characters may confirm the existence of a new clone.

Key words: *Allium sativum*, *in vitro* culture, chromosome irregularities, chromosome number, karyotype.

A. Ordóñez, L. E. Torres y J. Muñoz Facultad de Ciencias Agropecuarias-Universidad Nacional de Córdoba. CC 509-5000 Córdoba. M. Hidalgo. Tesista de Grado de la Carrera Ciencias Biológicas. Fac. de Cs. Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba. E-mail: aordonez@agro.uncor.edu

INTRODUCCIÓN

El ajo (*Allium sativum* L) es una de las especies de aliáceas más difundidas y utilizadas por el hombre, tanto con fines culinarios como medicinales (Kotlinska *et al.*, 1990; Koch, 1993). Si bien en la actualidad se ha identificado germoplasma fértil lográndose hibridación sexual en esta especie (Jenderek and Hannan, 2000), el mejoramiento genético tradicional en ajo se ha concentrado en los sistemas de producción propagados vegetativamente (Voss, 2000). En estas condiciones las únicas fuentes de variabilidad genética son las mutaciones somáticas y/o más raramente el crossing-over somático; esto llevó al desarrollo de distintos métodos biotecnológicos como el cultivo *in vitro*, con la finalidad tanto de obtener y clasificar germoplasma como de propagar vegetativamente la especie (Conci y Nome, 1991).

Las plantas regeneradas a partir del cultivo de callos (organogénesis indirecta) se caracterizan por presentar una considerable variabilidad en los rasgos morfológicos y genéticos (Sunderland, 1977; Novák, 1990; D'Amato, 1995). A nivel citológico y genético, esta variación somática o variación somaclonal se manifiesta con la ocurrencia de aberraciones cromosómicas (poliploidías, aneuploidías), activación de elementos transponibles, cambios de metilación de bases y otras irregularidades en el ADN (Peschke, 1992). También son comunes los cambios fenotípicos, observándose variaciones en altura, ancho y color de la hoja protectora, en la formación del escapo floral, tamaño y forma del bulbo y en el número de bulbillos (Burba y Blanco, 1986; Novák, 1990). Existe, además, gran variabilidad en cuanto a la madurez, dormancia y requerimientos de frío (Burba y Blanco, 1986).

Mediante la aplicación de técnicas de multiplicación *in vitro* para la propagación de ajo tipo comercial "rosado" se indujo la formación de callos, a partir de los cuales se obtuvieron mericlones con características fenotípicas diferentes (cambios en el ancho de las hojas, en el diámetro del pseudotallo y en el número de bulbillos por bulbo). Luego de varias multiplicaciones a campo se seleccionó uno de esos clones, designado como 118.15, que mostraba características altamente deseables desde el punto de vista agronómico (Muñoz *et al.*, 1995).

Con el fin de determinar si las diferencias observadas entre el clon 118.15 y el clon testigo obtenido del tipo comercial "Rosado" se deben a diferencias en la constitución cromosómica de los materiales, se plantearon como objetivos del presente trabajo analizar el cariotipo del clon 118.15 de ajo y comparar sus características fenotípicas con las del testigo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 15 bulbos del clon 118.15 de ajo (*Allium sativum* L), provenientes de las parcelas de multiplicación de minibulbillos libres de virus, obtenidos por el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. A partir de cada bulbo se tomaron 2 bulbillos para utilizarlos en los análisis citológicos y el resto fue empleado en el ensayo a campo. Como testigo se utilizó otro clon libre de virus que durante su desarrollo no difirió fenotípicamente del tipo comercial "rosado".

Para los estudios citológicos se hizo germinar en cubetas con agua destilada a temperatura ambiente un total de 60 bulbillos (30 del clon 118.15 y 30

del clon testigo). Cuando las raicillas alcanzaron 1-1,5 cm de longitud fueron removidas de los bulbillos y pretratadas en frío (0 - 4°C) durante 24 horas. Una vez finalizado el pretratamiento, los meristemas fueron fijados en mezcla Farmer (alcohol etílico y ácido acético glacial, 3:1 v/v) a temperatura ambiente durante 24 horas. El material fue hidrolizado en una solución de ácido clorhídrico 1N, en baño térmico a 60° durante un minuto y fue teñido con orceína lactopropiónica (Dyer, 1963). Los preparados se hicieron permanentes mediante la técnica de Bradley (1948). Se observaron y fotografiaron 4 células por individuo, utilizando un fotomicroscopio Zeiss y película Kodak T-max.

Se llevó a cabo el recuento cromosómico y la observación de irregularidades durante la mitosis. Se midieron además las siguientes características cromosómicas: longitud del brazo corto (s), longitud del brazo largo (l), longitud total de brazos (c) e índice braquial ($r=l/s$). Los cromosomas fueron clasificados en metacéntricos (m), submetacéntricos (sm), subtelocéntricos (st) y telocéntricos (t), según la clasificación propuesta por Levan *et al.* (1964), y los satélites fueron designados de acuerdo a la nomenclatura de Battaglia (1955). Los idiogramas se construyeron ordenando los cromosomas en grupos de acuerdo a su índice braquial, y dentro de cada grupo en forma decreciente por su tamaño. La asimetría del cariotipo se calculó según los índices de Romero y Zarco (1986) y se lo clasificó según las categorías de asimetría de Stebbins (1971). Los resultados obtenidos fueron sometidos al análisis de la varianza.

Para los estudios fenotípicos se sembraron un total de 90 bulbillos por clon según un diseño en bloques completamente aleatorizado con tres repeticiones, distribuidos a una distancia de 0,70 m entre surcos y 0,125 m dentro de cada surco. La siembra se llevó a cabo en una zona alejada de los cultivos comerciales con el fin de mantenerlos libres de virus. Las variables medidas fueron: altura de planta (cm), diámetro del pseudotallo (cm), ancho de la hoja media (cm) y largo de la tercera hoja (cm). A cosecha se determinó peso promedio del bulbo (g), peso promedio de los bulbillos (g) y número de bulbillos por bulbo.

Los resultados fueron sometidos a un análisis multivariado (ANAVA) para establecer diferencias entre los clones. Se estimó además la correlación fenotípica entre las variables analizadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tanto en el clon 118.15 como en el testigo se observó el mismo número de cromosomas somáticos $2n=16$ (Figura 1). Estos resultados coinciden con la mayoría de los estudios citológicos realizados en ajo (*Allium sativum* L.), en los que se cita $2n=16$ como número cromosómico de la especie (Battaglia, 1963; Vermay Mittal, 1978; Koul *et al.*, 1979).

En algunos individuos del clon 118.15 se observaron células poliploides con $2n=28$, 30 y 32 (Figura 2a), células con un número cromosómico aneuploide $2n=6$ y 10 y células con un número cromosómico haploide $2n=8$ (Figura 2b), éstas últimas presentes en menor proporción. La presencia de células con diferente grado de ploidía puede explicarse mediante la ocurrencia de endomitosis, fusión nuclear o la combinación de ambos procesos (Partanen, 1965); mientras que la reducción somática completa que dio origen a células haploides se explicaría mediante el apareamiento de homólogos en las células somáticas (Novák, 1974).

Con respecto a las irregularidades mitóticas, ambos clones mostraron en la mayoría de sus células una disyunción cromosómica normal. Sin embargo, se observaron ocasionalmente células en anafase y telofase que presentaban cromosomas retrasados y puentes cromosómicos (Figura 3a-b), aberraciones que fueron más frecuentes en el clon 118.15. Se observaron además células binucleadas y una pequeña proporción de disturbios en el huso mitótico. La ocurrencia de puentes cromosómicos y cromosomas rezagados está directamente relacionada con la formación de micronúcleos (Figura 3c) y la aparición de aneuploidías debido a la pérdida o ganancia de cromosomas (Novák, 1974; Sunderland, 1977; Novák, 1981; D' Amato, 1990).

Los estudios citológicos del clon 118.15 revelan un comportamiento inestable de éste con respecto al testigo. La estabilidad en cuanto al número cromosómico depende de la correcta disyunción de los cromosomas durante la anafase (Luykx, 1970; Papes *et al.*, 1983).

Por otra parte, ambos clones están compuestos por 8 pares cromosómicos que conforman un cariotipo simétrico, categoría 1A según la clasificación de Stebbins (1971) (Figura 4). El par 1 (que presenta la mayor longitud) y el par 5 (que presenta la menor longitud) fueron fácilmente identificados. Los pares 2, 3 y 4 fueron reconocidos una vez realizadas las mediciones, ya que dada la similitud en el largo de los tres pares, el reconocimiento de homólogos resultó difícil. Los tres pares restantes se identificaron claramente ya que los pares 6 y 8 presentaban



Figura 1 - Metafase normal ($2n=16$) del clon 118.15 de ajo. Las flechas indican los satélites. La barra indica 10μ .



a)

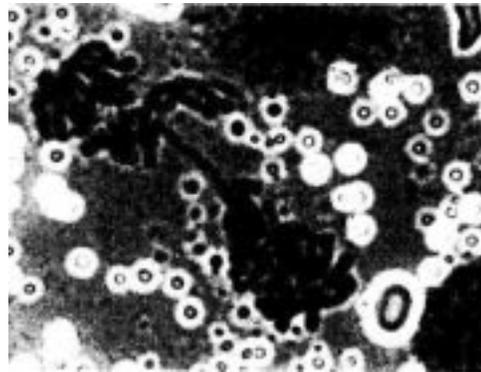


b)

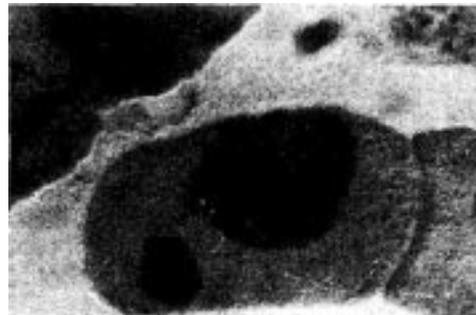
Figura 2 - Placas metafásicas del clon 118.15 de ajo con distinto grado de ploidía: a) Metafase en una célula poliploide, b) Metafase en una célula haploide. La barra indica 10μ .



a)



b)



c)

Figura 3 - Aberraciones cromosómicas en el clon 118.15 de ajo: a) Anafase poliploide con cromosomas rezagados, b) puente cromosómico, c) célula con micronúcleo. La barra indica 10μ .

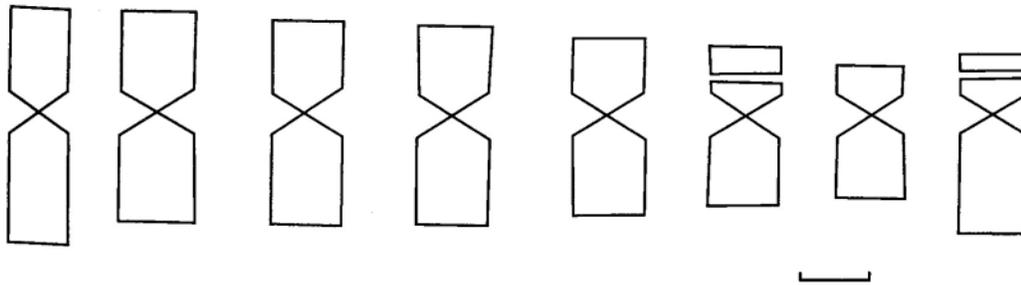


Figura 4 - Idiograma perteneciente al clon 118.15 de ajo. La barra indica indica 10 μ .

satélites y el par 7 era el de longitud menor (aproximadamente la mitad del cromosoma 1). De los dos pares satelizados, el cromosoma 8 fue el de mayor tamaño y el más asimétrico. Su satélite, que junto con un pequeño segmento intercalar conformaba el brazo corto, se encontró en el 25 % de las células analizadas separado del resto del cromosoma; mientras que el par 6 presentó un satélite más grande que se encontró separado del resto del cromosoma en el 70 % de los casos. Cabe destacar que el satélite era claramente visible sólo en uno de los miembros de cada par satelizado.

El análisis de la varianza reveló diferencias significativas ($P < 0,05$) en cuanto a la longitud de cada par cromosómico, mientras que no se observaron diferencias para los índices braquial y de asimetría A_1 y A_2 (Tabla 1). Dentro del grupo de cromosomas metacéntricos largos, el par 1 fue el más heteromórfico; en cuanto a los cromosomas pequeños, los pares satelizados fueron los más desiguales, mientras que el par menos heteromórfico fue el 4.

Tabla 1 - Comparación entre las características citológicas de los clones 118.15 y testigo de ajo (*Allium sativum* L.).

Variables	Clon	
	118.15	Testigo
2n	16	16
Fórmula cromosómica	7m + 1 sm	7m + 1 sm
Satélites	pares 6 y 8	Pares 6 y 8
LTC (μ)	106,03 a	121,64 b
c	13,25	15,20
r	1,38 a	1,35 a
A_1	0,255 a	0,249 a
A_2	0,180 a	0,207 a

letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

m: metacéntrico; sm: submetacéntrico; LTC: Longitud total cromosómica del complemento haploide; c: longitud total de brazos; r: índice braquial; A_1 y A_2 : índices de asimetría de Stebbins

Al comparar el cariotipo del clon 118.15 con el testigo no se observaron marcadas diferencias en la estructura del complemento. Si bien se encontraron diferencias en la longitud cromosómica total, tales diferencias pueden atribuirse tanto a variaciones durante la experimentación como al tipo y concentración de sustancias de reserva presente en los bulbillos, que afectan el tamaño y el volumen de los cromosomas (Bennett y Rees, 1969).

El análisis estadístico de los caracteres fenotípicos demostró la existencia de diferencias significativas entre los clones (Tabla 2). El clon 118.15 resultó significativamente más alto, con mayor diámetro del pseudotallo y mayor peso medio del bulbillo, mientras que el número de bulbillos por bulbo fue menor. No se observaron diferencias significativas en el largo y el ancho de la tercera hoja.

El análisis de correlación fenotípica (Tabla 3) mostró que el largo de la tercera hoja está positiva y significativamente asociado con su ancho y la altura de la planta. También se observó una asociación positiva entre diámetro del pseudotallo y altura de planta, diámetro del pseudotallo y peso del bul-

Tabla 2 - Valores medios de los caracteres fenotípicos de los clones 118.15 y testigo de ajo (*Allium sativum* L.).

Variables	Clon	
	testigo	118.15
Largo 3 ^{er} hoja (cm)	50,20 a	50,36 a
Ancho de la hoja (cm)	2,75 a	3,04 a
Diámetro del pseudotallo (cm)	1,61 a	2,05 b*
altura de planta (cm)	63,81 a	67,81 b
peso promedio del bulbo (g)	89,34 a	95,87 b
peso medio del bulbillo (g)	3,00 a	5,10 b
N° de bulbillos por bulbo ⁻¹	26,02 b	14,28 a

letras distintas en la fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

*diferencias significativas ($P < 0,01$)

Tabla 3 Correlación fenotípica entre los rasgos morfológicos de importancia agronómica del clon 118.15 de ajo, considerados en este estudio.

Rasgos morfológicos	Ancho de la hoja	Diámetro del pseudotallo	Altura de planta	Peso del bulbo	Peso medio del bulbillo	N° bulbillos bulbo ⁻¹
Largo tercera hoja	0,31*	0,05	0,30*	-0,03	-0,08	0,08
Ancho de la hoja		0,47*	0,03	0,24*	-0,18	0,35*
Diámetro del pseudotallo			0,25*	0,58*	0,04	0,25*
Altura de planta				0,21	0,19	0,06
Peso del bulbo					0,38*	0,16
Peso medio del bulbillo						-0,75*
N° bulbillos bulbo ⁻¹						

* diferencias significativas a un nivel de probabilidad de 0,05

bo, diámetro del pseudotallo y número de bulbillos por bulbo; mientras que la correlación entre el número de bulbillos por bulbo, y entre peso del bulbo y peso medio de los bulbillos resultó significativamente negativa.

Las diferencias observadas en cuanto al diámetro del pseudotallo, mayor en el clon 118.15, podrían estar relacionadas con la existencia de bulbillos laterales, más numerosos y desarrollados que en el testigo. Por otra parte, la disminución en el número de bulbillos determinó un incremento del peso medio de éstos. Estos resultados coinciden con los de ensayos previos en los que el clon 118.15 poseía bulbos con "dientes" más grandes y en menor cantidad que el tipo comercial "rosado", manteniendo el peso del bulbo constante (Muñoz *et al.*, 1995).

CONCLUSIONES

El análisis citológico del clon 118.15 permitió detectar irregularidades cromosómicas aunque sin definir un cariotipo distinto. Las diferencias fenotípicas observadas, con respecto al clon testigo, para algunos caracteres indicarían la existencia de un nuevo clon, siendo sin dudas el menor número de bulbillos por bulbo y el mayor peso medio de los bulbillos los rasgos que más lo distinguen del testigo.

BIBLIOGRAFÍA

- Battaglia, E. 1955. Chromosome morphology and terminology. *Caryologia* 8: 179-187.
- Battaglia, E. 1963. Mutazione cromosómica e cariotipo fondamentale in *Allium sativum* L. *Caryologia* 16: 1-46.
- Bennett, M. D. and H. Rees. 1969. Induced and developmental variation in chromosomes of meristematic cells. *Chromosoma* (Berl.) 27: 226-224.
- Bradley, M. V. 1948. A method for making aceto-carmine squashes permanents without removal of the cover slip. *Stain Technology* 23:41-44.
- Burba J. L. y M. P. Blanco. 1986. El índice visual de superación de dormición (IVD) como parámetro para el agrupamiento de cultivares en colecciones y bancos de germoplasma. En: 9^{na} Reunión Nacional de la Asociación Argentina de Horticultura y 2^{da} Reunión Latinoamericana de Horticultura. La Plata, p. 66.
- Conci V. and S. F. Nome. 1991. Virus free garlic (*Allium sativum* L.) plants obtained by thermotherapy and meristem tip culture. *J. Phytopathology* 132: 186-192.
- D'Amato, F. 1990. Somatic nuclear mutations *in vivo* and *in vitro* in higher plants. *Caryologia*43:191-204.
- D'Amato, F. 1995. Aneusomaty *in vivo* and *in vitro* in higher plants. *Caryologia* 48: 85-103.
- Dyer, A. F. 1963. The use of lacto-propionic orcein in rapid squash methods for chromosome preparations. *Stain Technology* 38: 85-90.
- Jenderek, M. and R. Hannan. 2000 Seed producing ability of garlic (*Allium sativum* L.) clones from two public U.S. collections. The 3rd International Symposium on edible *Alliaceae*. Pag. 14 *Georgia* EEUU.
- Koch, H.P. 1993. Garlicin-factor fiction? The antibiotic substance from garlic (*Allium sativum*). *Phytotherapy Res.* 7: 278-280.
- Kotinska, T. P.; P. Naranek; A. Navratill; L. Gerosimova; A. Pimakhov and S. Niekouv. 1990. Collecting onion, garlic and wild *Allium* in Central Asia. *Plant Genetic Res. Newsletter* 83/84: 31-32.
- Koul, A. K.; R. N. Gohil and A. Langer. 1979. Prospects of breeding improved garlic in the light of its genetic and breeding systems. *Euphytica* 28: 457-464.
- Levan, A.; K. Fredga and A. Sandberg. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Luykx, P. 1970. Cellular mechanism of chromosome distri-

- bution. Int. Rev. Cytol.. Suppl. 2.
- Muñoz, J. O.; M. C. Salvadores; G. I. Viotti; M. C. Sosa; P. A. Navelino y C. A. Martino. 1995. Obtención de variabilidad en ajo "Rosado Paraguayo" por medio del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* y sus posibilidades de aplicación. En: IV Curso-Taller sobre Producción, comercialización e industrialización de ajo, INTA-EEA La Consulta. Pp. 7-15. Mendoza.
- Novák, F. J. 1974. The changes of karyotype in callus cultures of *Allium sativum* L. Caryologia 27: 45.
- Novák, F. J. 1981. Chromosomal characteristics of long-term callus culture of *Allium sativum* L. Cytologia 46: 431.
- Novák, F. J. 1990. *Allium* tissue culture. In: Rabinowitsch, H. D. and Brewster, J. L. (Eds.), *Onion and Allied Crops* Vol. 1, pp. 233-250. CRC Press. Boca Ratón, Florida.
- Papes, V.; Garaj - Vrhovac; S. Jelaska and B. Kolevska 1983. Chromosome behavior in cultured cell populations of higher plants. Plant Chromosome Behavior *in vitro* pp. 155-163.
- Partanen, C. R. 1965. Plant Tissue Culture in Relation to Developmental Cytology. Int. Rev. Cytol. 15: 215-243.
- Peschke, V. 1992. Genetic implications of somaclonal variation in plants. Advances in Genetics 30: 41-75.
- Romero and C. Zarco 1986. A new method for estimating karyotype asymmetry. Taxon 35: 526-530.
- Stebbins, G. L. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. I-VIII, 216 p. Arnold Ltd., London.
- Sunderland, N. 1977. Nuclear cytology. In: Street, H. E. (Ed.), Plant Tissue and Cell Culture, pp. 161-190. Blackwell Sci. Publ., Oxford.
- Verma, S. C. and R. K. Mittal 1978. Chromosome variation in the common garlic. Cytologia 43: 383-396
- Voss, R. E. 2000. Garlic research emphases and activities worldwide. The 3rd International Symposium on edible *Alliaceae*. pag. 14 .Georgia EEUU