

CARACTERIZACION CARIOTIPICA DE 34 CLONES DE AJO (*Allium sativum* L.)¹

Karyotypic characterization of 34 garlic (*Allium sativum* L.) clones

Tadayuki Toyao², Moisés Escaff G.³, Carlos Muñoz S.³

SUMMARY

Karyotype of 34 garlic clones, kept at the Chilean Instituto de Investigaciones Agropecuarias gene bank, was determined. After testing various cytological techniques, root tips were pre-treated with 0.1% Colchicine for 3 hr, fixed in Ethanol: Acetic Acid (3:1) for over 2 hr, macerated in 0.2 N HCl at 60 °C for 3 min, stained with 1% Acetocarmine and squashed for observation with a phase contrast microscope at 1.000x.

All clones had $2n=16$ chromosomes, with 24 of them having a basic karyotype in which chromosomes 1, 2, 3, and 4 were long and metacentric; chromosome 5, medium and metacentric; chromosome 6 medium, subacrocentric, and with satellite; chromosome 7 medium, submetacentric, and also with satellite; and chromosome 8, short and submetacentric. Karyotype of 10 clones were different from the basic type in that in chromosome 7 some of these clones showed no satellite; in chromosome 6, the short arm is smaller and the satellite was not present; chromosomes 5 and 8, were submetacentric; and in certain chromosomes pairs were not equal. No clear relation was observed between chromosome structure and provenance, morphology or growth cycle of the different clones studied.

Key words: garlic, *Allium sativum*, chromosomes, cytological techniques.

INTRODUCCION

El ajo es una de las especies cultivadas más antiguas en la historia de la humanidad. Ha sido utilizado por el hombre para su alimentación, como condimento y producto terapéutico, desde varios cientos de años antes de Cristo hasta nuestros días. La reproducción de esta especie ha sido siempre vegetativa, ya que por sus anormalidades en la floración, es una planta apomítica obligada. A pesar de ello, la especie presenta una gran variabilidad fenotípica, principalmente en las características de los bulbos como el número de dientes, la precocidad de formación de éstos, el color de sus envolturas, etc.

Gran parte de la variabilidad observada podría ser explicada por la influencia de factores ambientales, a pesar que algunos caracteres permanecen

invariables aun cuando las plantas se cultiven en ambientes muy diversos. Por lo tanto, parte importante de la variabilidad es genética y tendría origen en la acumulación de aberraciones cromosomales y de mutaciones a través del tiempo, e incluso, en hibridaciones somáticas a nivel cromosómico (Koul, Gohil y Langer, 1979).

Estas modificaciones cromosómicas se traducen en una serie de cariotipos diversos, los que han sido estudiados, entre otros, por Battaglia (1963), Konvicka y Levan (1972), Verma y Mittal (1978) y Etoh (1985).

En el presente trabajo se determinaron los cariotipos de un grupo selecto de clones mantenidos en el banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) de Chile, el que cuenta con más de 80 clones de esta especie (Escaff y Cortés, 1991). Con ello se espera contribuir a su caracterización y al conocimiento de su genealogía.

Para estudiar el cariotipo de cada clon, primero fue necesario establecer técnicas que permitieran observar los cromosomas con claridad, para lo cual previamente se evaluaron diversos métodos citológicos.

¹Recepción de originales: 24 de julio de 1992.

²Proyecto JICA-INIA, Estación Experimental La Platina (INIA), Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.

³Estación Experimental La Platina (INIA), Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.

MATERIALES Y METODOS**Genotipos utilizados**

Se eligieron 34 clones de entre los existentes en el banco de germoplasma de ajos del INIA. De ellos, 17 corresponden a materiales recolectados en Chile

y el resto a material importado desde diversos países extranjeros. Estos clones fueron elegidos de modo de tener un claro grado de diferenciación fenotípica. El nombre de los clones y alguna de sus características más relevantes se señalan en el Cuadro 1.

CUADRO 1. Nombre, origen y características de los clones utilizados para la caracterización cariotípica del ajo

Table 1. Name, origen and characteristics of garlic clones used for their karyotypic characterization

Nombre del clon	Origen	Cromosoma N ^o							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Morado Ariqueño	Chile	207	8,8	2	66	8,9	9	5	0
Arica I Región	Chile	207	10,4	2	57	14,6	1-9	4	0
Blanco Camiña	Chile	190	10,6	2	60	14,6	1-2	2	0
Rosado Camiña	Chile	207	8,0	3	65	14,2	1	3	94
Luteño	Chile	179	8,8	3	64	12,1	9	5	0
Calle Chica	Chile	221	8,8	3	53	21,5	1	5	0
Antofagasta	Chile	207	8,8	2	58	16,5	1-2	1-2	0
Río Grande Calama	Chile	207	10,8	3	21	14,8	1	1	0
Blanco Andino	Chile	221	8,8	2	52	18,7	1-2	3	0
Rosado Copiapino	Chile	207	10,2	2	60	19,9	1	1	0
Rosado Platina	Chile	207	8,2	2	65	14,4	1	3	86
Constitución	Chile	207	9,4	2	54	15,5	1-9	2-5	0
Nirivillo	Chile	190	9,4	2	60	16,8	1	1-2	0
Talca	Chile	214	10,6	2	56	19,1	1	5	0
Pircunche	Chile	221	8,0	3	57	31,2	1	3	0
Chile Chico	Chile	221	9,0	3	59	18,0	1	3-2	0
Quepe	Chile	221	9,2	3	52	22,5	1	3	0
Ruso Coyhaique	Chile	221	9,4	3	53	34,5	1	5	0
Blanco Mendoza	Argentina	207	9,6	2	57	17,1	1	1	0
Blanco Maipú	Argentina	207	9,2	2	59	15,2	1-2	1-2	0
Rojo Maipú	Argentina	214	9,2	2	64	12,5	1	3	0
Rosado Marfil C.	Bolivia	190	9,0	2	62	36,5	1	5	32
Uruguay GLB	Uruguay	207	7,8	2	62	18,2	1	3	97
Mexicano Blanco KB	México	185	8,6	2	61	16,1	1	3	0
Mexicano Morado	México	179	9,8	2	59	13,8	9	5	0
Rojo Americano	E.U.A.	207	8,4	2	65	12,4	1	5	84
Rosado-INIA	España	214	9,4	2	61	11,9	1-9	3	69
Rosé de Lautrec	Francia	221	8,8	3	45	16,2	1	3	0
Messidrome	Francia	207	8,2	1	53	9,4	1	2	0
Egipto	Egipto	179	7,6	3	55	ND,*	1	3-2	0
Egipto Básico	Egipto	179	8,4	3	59	21,2	1-9	1-5	0
Fukuchi White	Japón	207	9,2	3	55	6,6	1	2-5	18
Chino	China	142	11,0	2	61	4,1	9	5	0
Taiwan Básico	Taiwán	142	10,4	2	61	5,0	9	5	0

1: Ciclo vegetativo: número de días de siembra a cosecha.

2: Número de hojas promedio.

3: Color de las hojas: (1): verde claro, (2): verde, (3): verde oscuro.

4: Angulo de inserción de las hojas.

5: Número promedio de dientes por cabeza.

6: Color de las cutículas externas: (1): blanco, (2): amarillo claro, (9): morado.

7: Color de la hoja envolvente del diente (1): blanco, (2): amarillo claro, (3): rosado, (4): rosado claro, (5): morado.

8: Porcentaje de plantas que florecen.

*No determinado.

Técnica de preparación de puntas de raíz para estudios citológicos

El material vegetal utilizado fueron puntas de raíz que se obtuvieron de bulbillos (dientes), cuyo tercio inferior fue sumergido en agua destilada por 48 horas, hasta que hubo emergencia de raíces nuevas. Las preparaciones se realizaron dando un pre-tratamiento, fijando las puntas de raíz, macerándolas y tiñéndolas de acuerdo a protocolos conocidos (Sharma y Sharma, 1965). Para ello, se cortó 1 cm de las puntas de las raíces, el que fue sometido a pre-tratamientos con concentraciones de colchicina de 0; 0,05; 0,25 y 0,5% por 1,5; 3,0 y 4,0 horas en cada concentración, y utilizando el clon Rosé de Lautrec. La fijación del material se realizó en una mezcla de etanol 90% y ácido acético glacial, en proporción de 3:1, por, a lo menos, 2 horas. Para el proceso de maceración se evaluaron 4 concentraciones de ácido clorhídrico (HCl): 0,05; 0,10; 0,20 y 1,00 N, a 60 °C por 3 minutos, utilizando el clon Rosado-INIA. La tinción se realizó con acetocarmín al 1%.

Finalmente, las observaciones se hicieron con un microscopio con contraste de fase y con un aumento de 1.000x.

Determinación de los cariotipos

Una vez conocidas las condiciones óptimas, tanto para el pre-tratamiento como para la maceración de los tejidos, se procedió a generar los cariotipos de cada uno de los clones bajo estudio. Se estableció un idiograma del cariotipo básico, basándose en la información disponible en la literatura (Konvicka y Levan, 1972) y en las distintas observaciones realizadas, considerando el cariotipo más frecuentemente observado. Luego se determinaron las variaciones de cada genotipo en estudio con respecto al cariotipo básico, mediante la observación de, a lo menos 10 preparaciones por clon. Luego de estudios comparativos, se agruparon los clones de acuerdo a sus características específicas. La nomenclatura utilizada para la caracterización cromosómica fue la utilizada por Konvicka y Levan (1972).

RESULTADOS

Efecto de pre-tratamientos con diferentes concentraciones de colchicina

De las concentraciones de colchicina usadas, la de 0,25%, aplicada por 3 ó 4 horas, fue la más adecuada, ya que hubo un adecuado número de células metafásicas y la morfología de los cromosomas

pudo caracterizarse adecuadamente. Resultados similares se lograron con concentraciones de 0,5%, aplicadas por el mismo tiempo. Los demás tratamientos fueron inadecuados (Cuadro 2).

Efecto de diferentes concentraciones de HCl sobre la maceración de los tejidos

La mejor maceración se logró al tratar las raíces con HCl 0,2 N, concentración que resultó superior a 0,1 N. Tratamientos con concentraciones menores no presentaron actividad suficiente como para obtener una maceración adecuada (Cuadro 2).

Estudio de los cariotipos

Las observaciones microscópicas permitieron confirmar que los 34 clones estudiados poseían un $2n = 16$ cromosomas, observándose importantes diferencias en el cariotipo de los diferentes clones.

Se identificó un grupo de 24 clones (Arica, Blanco Camiña, Rosado Camiña, Antofagasta, Río Grande Calama, Blanco Andino, Rosado Copiapino, Rosado Platina, Constitución, Nirivillo, Talca, Chile Chico, Ruso Coyhaique, Blanco Mendoza, Blanco Maipú, Rojo Maipú, Rosado Marfil Criollo, Uruguay GLB, Mexicano Blanco KB, Rosado-INIA, Messidrome, Egipto, Egipto Básico y Fukuchi White) que poseen

CUADRO 2. Efecto de pre-tratamientos con distintos tiempos y concentraciones de colchicina y diferentes concentraciones de HCl para la maceración de puntas de raíz, usados en preparaciones citológicas destinadas a la observación de cromosomas de ajo

TABLE 2. Effect of different colchicine pre-treatments and HCl concentrations for maceration of root tips used to prepare squashes for observation of garlic chromosomes

Concentración de colchicina (%)	Tiempo de tratamiento, horas		
	1,5	3,0	4,0
0,00	0	0	0
0,05	0	+	+
0,25	0	+++	+++
0,50	0	++	++

Maceración	Concentración de HCl			
	0,05 N	0,01 N	0,2 N	1,0 N
Maceración	0	++	+++	0

0 Malo; + Regular; ++ Bueno; +++ Muy bueno.

un cariotipo básico. Una microfotografía del clon Mexicano Blanco KB y Rosado-INIA ilustra este cariotipo básico (Figura 1), cuyo idiograma se presenta en la Figura 2. En este cariotipo básico, los cromosomas N° 1, 2, 3 y 4 fueron largos y metacéntricos. El cromosoma N° 5, fue de longitud media y también metacéntrico. El N° 6, de longitud media y subacrocéntrico, con una constricción secundaria. El N° 7, de longitud también media, sub-metacéntrico y con constricción secundaria. Por último, el N° 8, fue corto y submetacéntrico. Por lo tanto, el cariotipo básico contiene 10 cromosomas medios, 2 subterminales con constricción secundaria, 2 submedios con constricción secundaria y 2 submedios.

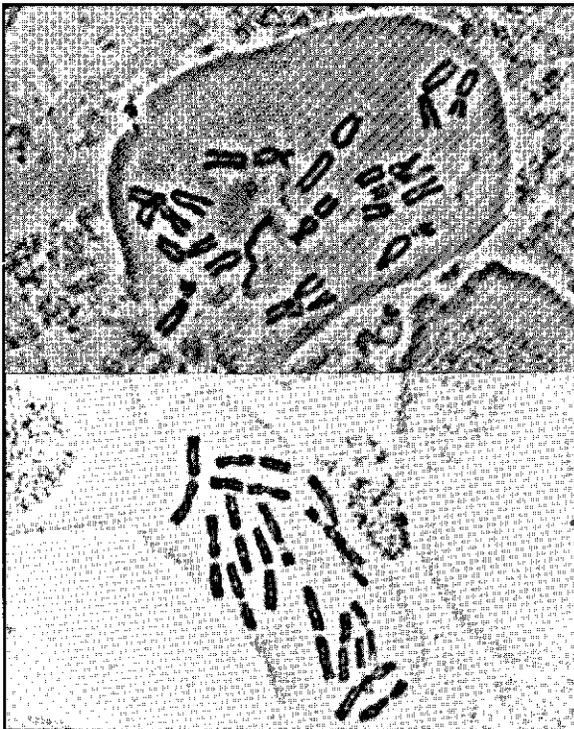


FIGURA 1. Microfotografía de los clones Mexicano Blanco (superior) y Rosado-INIA (inferior), que representan el cariotipo básico.

FIGURE 1. Microphotography of Mexicano Blanco (upper) and Rosado-INIA (lower) showing the basic karyotype.

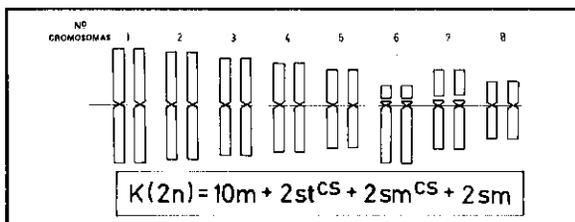


FIGURA 2. Idiograma del cariotipo básico de clones de ajo.

FIGURE 2. Basic karyotype ideogram of garlic clones.

En el Cuadro 3, se presenta la longitud total y la relación entre la longitud del brazo corto y largo de cada uno de los cromosomas. Se observa que el cromosoma más corto (N° 8), tiene casi la mitad de la longitud del cromosoma más largo (N° 1). Además, el cromosoma N° 6, se caracteriza por poseer uno de los brazos muy corto.

CUADRO 3. Largo relativo y relación entre la longitud del brazo largo y corto para cada uno de los cromosomas del ajo

TABLE 3. Relative length and relation between the length of the long and short arm in garlic chromosomes

Cromosoma N°	Largo relativo ¹	Razón de brazo ²
1	16,5 ± 0,9	0,92 ± 0,05
2	15,3 ± 0,9	0,92 ± 0,06
3	14,1 ± 0,7	0,88 ± 0,07
4	13,0 ± 0,6	0,84 ± 0,10
5	11,5 ± 0,7	0,81 ± 0,11
6	10,7 ± 0,7	0,22 ± 0,04
7	10,5 ± 0,7	0,53 ± 0,05
8	8,4 ± 0,6	0,69 ± 0,08

¹Porcentaje del largo total de los cromosomas ± desviación estándar.

²Longitud del brazo corto/longitud del brazo largo desviación estándar.

De los 34 clones analizados, 10 mostraron diferencias con el cariotipo básico, observándose que estas diferencias se manifiestan, básicamente, en los cromosomas N° 5, 6, 7 y 8 (Figura 3), y afectan la relación entre la longitud del brazo corto y largo, la ubicación y presencia de la constricción secundaria y la presencia de pares desiguales (Cuadro 4). Es así como los clones Rojo Americano, Quepe, Taiwán Básico y Chino no presentan constricción secundaria en el cromosoma N° 7. Los clones Mexicano Morado y Morado Ariqueño no tienen constricción secundaria en uno de los cromosomas del par de los cromosomas N° 6 y 7. Los clones Lluteño y Calle Chica no poseen constricción secundaria en uno de los cromosomas del par N° 6. Igualmente, el clon Rose de Lautrec no forma pares iguales en el cromosoma N° 8 (Cuadro 4).

DISCUSION

Todos los estudios cariológicos en ajo señalan que el número de cromosomas de la especie es $2n = 16$ (Konvicka y Levan, 1972; Verma y Mital, 1978; Etoh, 1985), pero que existe una variabilidad estructural en ellos que afecta a un número significativo de clones (Koul y otros, 1979; Tanasch, 1984).

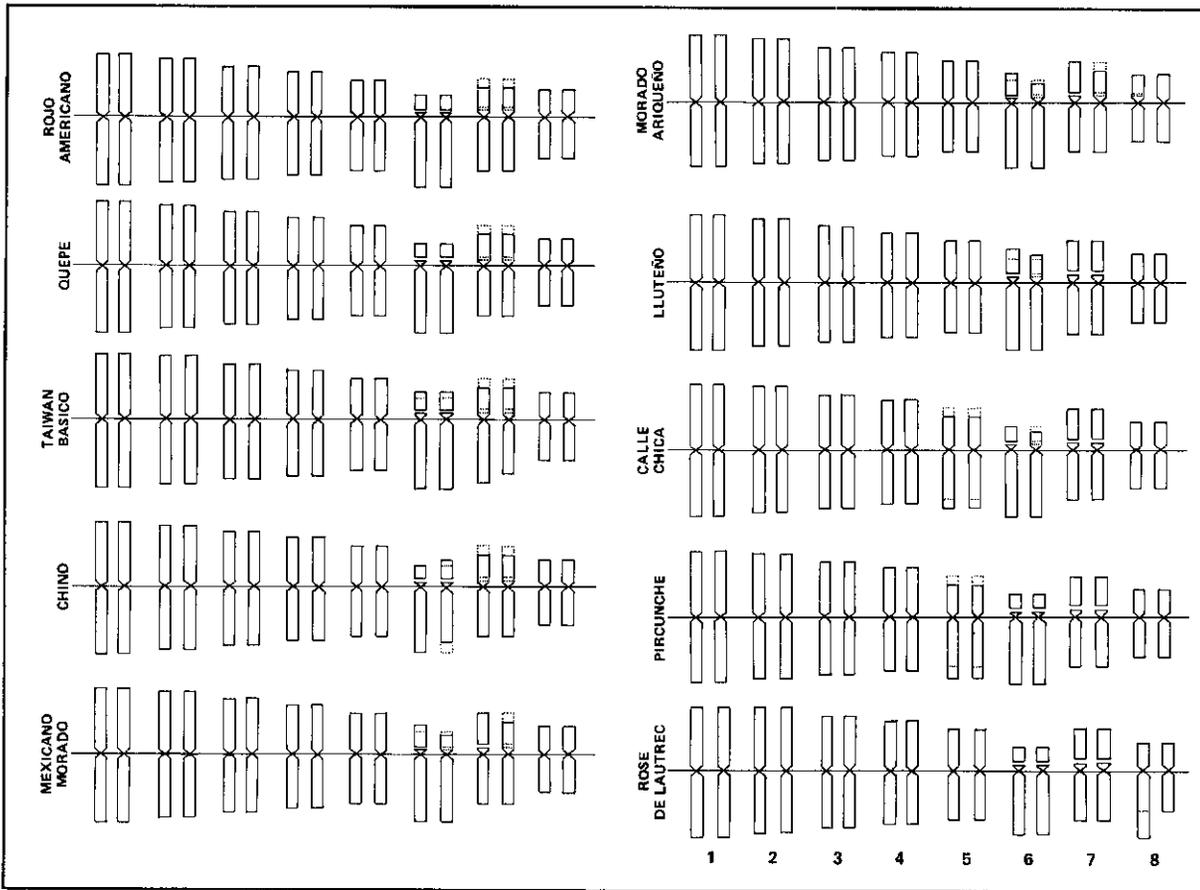


FIGURA 3. Idiograma de los clones de ajo diferentes al cariotipo básico.

FIGURE 3. Garlic clones idiograms different to the basic karyotype.

CUADRO 4. Diferencias observadas en las características estructurales de los cromosomas Nº 5, 6, 7 y 8 de diferentes clones de ajos

TABLE 4. Structural differences observed in chromosomes Nº 5, 6, 7, and 8 in different garlic clones

Clones	Cromosoma Nº				Pares
	5	6	7	8	
Rojo Americano			Sin CS*		Iguals
Quepe			Sin CS		Iguals
Taiwan Básico			Sin CS		Iguals
Chino			Sin CS		Iguals
Mexicano Morado		Sin CS(1)	Sin CS(1)**		Desiguales
Morado Ariqueño		Sin CS(1) RB (1)	Sin CS(1)		Desiguales
Lluteño		Sin CS(1) RB (1)			Desiguales
Calle Chica	RB***	Sin CS(1)			Desiguales
Pircunche	RB				Iguals
Rose de Lautrec				RB(1)	Desiguales

* Constricción secundaria.

** El valor entre paréntesis indica en número de cromosomas del par.

*** RB: razón de brazo diferente al básico.

Estas observaciones han sido confirmadas en nuestro estudio, sin embargo, no fue posible establecer ninguna relación entre esta variación cariotípica con el origen, la morfología o la fenología de los clones estudiados. La diversidad fenotípica de los clones utilizados en este estudio, incluyó variaciones en el número de hojas aéreas, el color de éstas, el ángulo de inserción en el falso tallo, el número de dientes, el color de las cutículas internas

y externas de los bulbos y en el hábito de floración. Ninguna de estas características estuvo asociada con alguna de las singularidades encontradas en la estructura de los cromosomas en el grupo de clones estudiados. Esta observación implica que gran parte de la variabilidad presente en ajo no está ligada con las alteraciones estructurales de los cromosomas, como con frecuencia se postula (Koul, Gohil y Langer, 1979; Sharma, Koul y Langer, 1988).

RESUMEN

Se determinó el cariotipo de 34 clones de ajo, de distintos orígenes, presentes en el banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Luego de evaluar diversas técnicas se optó por pre-tratar puntas de raíces de 1 cm con colchicina al 0,1%, por 3 horas, para luego fijarlas en etanol: ácido acético (3:1), por 2 horas o más. Luego se maceraron en HCl 0,2 N a 60 °C por 3 minutos, se tiñeron con 1% acetocarmin, se montaron y se observaron al microscopio con contraste de fase a 1.000x. Los resultados mostraron que todos los clones poseen $2n = 16$ cromosomas. Del total de clones, 24 tienen un cariotipo básico, donde los cromosomas Nº 1, 2, 3 y 4 fueron de longitud grande, metacéntricos; el 5, de longitud media

y metacéntrico; el 6 de longitud media y subacrocéntrico, con satélite; el 7 de longitud media y submetacéntrico y con satélite y; el 8, corto y submetacéntrico. En 10 clones los cariotipos difirieron del básico en que en el cromosoma 7 falta el satélite; en el 6, el brazo corto es más largo que en el básico y también falta el satélite; en el 5 y 8, el centrómero es submetacéntrico; y, en algunos casos, ciertos cromosomas no forman pares iguales. No se encontró relación entre el origen, la morfología o el ciclo de crecimiento y las alteraciones cromosómicas observadas.

Palabras claves: ajo, *Allium sativum*, cromosomas, técnicas citológicas.

LITERATURA CITADA

- BATTAGLIA, E. 1963. Mutazione cromosomica e cariotipo fondamentale in *Allium sativum*. University of Yammu 31(1/2): 31-35.
- ESCAFF, M. y CORTES, I. 1991. Banco de germoplasma de ajo. Simiente 61(2-3):139 (Resumen).
- ETOH, T. 1985. Studies on the sterility in garlic, *Allium sativum* L. Memoirs of the Faculty of Agriculture, Kogoshima University 21:77-132.
- KONVICKA, O. and LEVAN, A. 1972. Chromosome studies in *Allium sativum*. Hereditas 72:129-148.
- KOUL, A.K., GOHIL, R. N. and LANGER, A. 1979. Prospects of breeding improved garlic in the light of its genetic and breeding systems. Euphytica 28:457-464.
- SHARMA, A.K. and SHARMA, A. 1965. Chromosome techniques: theory and practice. Butterworths, Washington, U.S.A.
- SHARMA, N., KOUL, A. K. and LANGER, A. 1988. Kariotipe polymorphism in *Allium sativum*. University of Yammu 31(1/2):31-36.
- TANASCH, L. 1984. Cytologisch-züchterische untersuchungen und Knoblauch (*Allium sativum*). I. Karyologische beobachtungen an einigen In- und Ausländischen klonpopulationen. Die Bodenkultur. 35:341-353.
- VERMA, S.C. and MITTAL, R. K. 1978. Chromosome variation in the common garlic, *Allium sativum* L. Cytologica 43:383-396.