

ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN Y AMPLIACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DEL GERMOPLASMA CUBANO DE AJO (*Allium sativum* L).

Antonio Pérez Lezcano, Victoria Moreno Fomental, Yadira Muñoz Pérez, Manuel Cervantes López y Emilio Reyes.

Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical “Alejandro de Humboldt” (INIFAT)

INTRODUCCIÓN

El ajo (*Allium sativum* L.) es una planta de reproducción asexual y las posibilidades de mejoramiento genético por los métodos tradicionales (cruzamientos) son limitadas, por lo que las investigaciones realizadas sobre el tema hasta la fecha son relativamente pocas. Sin embargo, en las poblaciones existe variabilidad genética (IBPGR, 1990; Moreno, 1995 y Escaff y Cortés, 1995) generada por mutaciones génicas y alteraciones estructurales de los cromosomas y acumuladas por varias generaciones (Koul y col., 1979). Es por ello, que Cornides (1985), Guarino y col. (1998) y Hodgkin y col. (2001) reportan al ajo como una especie apomíctica obligada que estuvo acumulando variaciones en muchos caracteres, existiendo evidencias de hibridación a nivel cromosómico, lo que sugiere la posibilidad del mejoramiento genético en esta especie.

La caracterización de la variabilidad genética en esta especie, no siempre ha permitido una clara diferenciación entre los clones comerciales, criollos y demás genotipos, así como realizar el estudio de toda la variabilidad existente en las poblaciones. Siendo necesario buscar otros caracteres genéticos menos influenciados por el ambiente (citogenéticos y moleculares) que permitan una identificación más precisa de todas las accesiones de ajo (Hodgkin y col., 2001). Por otra parte, las principales fuentes de variabilidad genética en Cuba son las colectas nacionales, la introducción de genotipos foráneos y la aplicación de las técnicas biotecnológicas. La adopción de nuevas tecnologías, tales como el cultivo de tejidos, pueden ayudar también a lograr algunas de las metas para incrementar la variabilidad genética en esta especie.

Las técnicas de cultivo de tejidos han sido utilizadas en este género con diferentes objetivos, como son la micropropagación acelerada, la inducción de variabilidad somaclonal y la conservación *in vitro* (Kim y col. 2003). La variación somaclonal producida mediante las técnicas de cultivo de tejidos puede ser usada también para generar nuevos cultivares (Linacero y Vázquez, 1992).

Por todo lo anterior, los objetivos del siguiente trabajo son incrementar y caracterizar la variabilidad genética de la colección nacional de ajo desde el punto de vista agronómico y citogenético y comenzar los estudios para la inducción de variabilidad genética con el uso de técnicas *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

I.- CARACTERIZACIÓN CITOGENÉTICA

a)- Selección del material de estudio

Para el estudio citogenético se seleccionaron 15 clones de ajo de diferentes localidades geográficas y se tomó como criterio de selección para el análisis de la variación

intraespecífica, lo reportado para la toma de muestra por Baverstock y Moritz (1990).

b)-. Caracteres analizados

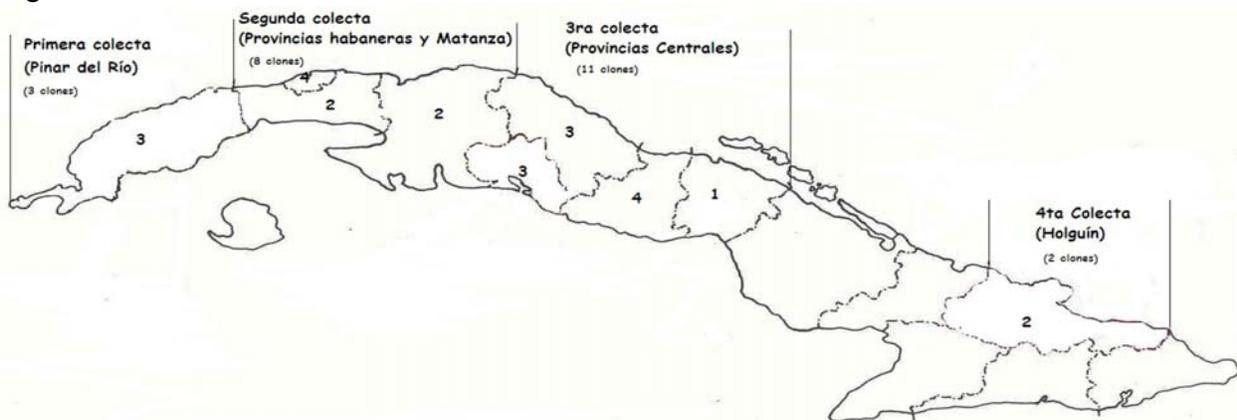
Para la coloración de Giemsa, las raíces se trataron según el método de Schwarzacher y col. (1980). Las fotos de los cariotipos (5 cariotipos por clon) fueron tomadas en un microscopio Karl Zeiss con un aditamento fotográfico, conformándose los ideogramas de las diferentes variedades. Las bandas (áreas de los cromosomas teñidas con intensidad) fueron divididas en cuatro clases, según su posición en los cromosomas (Linden-Laursen, 1984): Bandas centroméricas (situadas en la zona del centrómero); Bandas intercaladas (situadas a lo largo de los brazos de los cromosomas entre la región centromérica y la telomérica); Bandas teloméricas (situadas en los extremos de los brazos) y Bandas NORs (situadas en los organizadores nucleolares o satélites). A partir de este estudio citogenético se procedió a la caracterización de los cultivares a partir de los patrones de bandas C.

II.- AMPLIACIÓN DEL GERMOPLASMA Y CARACTERIZACIÓN MORFOAGRO-NÓMICA

a)-. Selección del material de estudio

Con el objetivo de recuperar e incrementar el número de accesiones del Banco de Germoplasma se realizaron 4 misiones de colecta de *Allium sativum* L. en diferentes regiones del país (figura 1) durante el periodo de 2001-2002 y en los meses en que el ajo se encuentra almacenado. Se visitaron un total de 53 fincas de campesinos y se colectaron un total de 24 accesiones de ajo (tabla 2).

Figura 1: Zonas de colectas



b)-. Caracteres analizados

Los materiales colectados fueron sembrados en áreas de la Estación de Banao (INIFAT), provincia de Sancti Spíritus, durante las campañas 2001-2002 y 2002-2003.

Las siembras se realizaron el día 27 de noviembre de 2001 y el 29 de noviembre de 2002, distribuyéndose los cultivares en un diseño de bloques al azar con 4 repeticiones (Goulden, 1952), ocupando cada variante una parcela experimental constituida por 2 surcos de 5mts de largo, sembrados a 2 hileras y a una distancia de 90 cm. entre surcos y 5 cm. entre plantas, para un área total de 9 m². Las labores culturales y fitosanitarias se realizaron de acuerdo con el Instructivo Técnico del Cultivo del Ajo (MINAG, 1983). Los caracteres evaluados fueron: En el bulbo: peso (PB) en gramos, diámetro (DB) en centímetros, altura (AB) en centímetros y la relación altura / diámetro (AB/DB). En el diente: peso (PD) en gramos, diámetro (DD) en centímetros, altura (AD)

en centímetros, la relación altura / diámetro (AD/DD). D/DD y el número de dientes (ND). En la planta: altura de las plantas (AP) en centímetros y en las hojas: número (NH), largo (LH) y ancho (AH) en centímetros.

c)-. Análisis matemáticos

Se realizó una matriz de correlaciones para estudiar Los caracteres de morfología y de bandeo de los cromosomas que más se correlacionan con los caracteres agromorfológicos analizados.

III-. CULTIVO DE TEJIDOS

a)-. Preparación del explante

Para determinar la mejor combinación hormonal y explante para la inducción de callos y regeneración de yemas se utilizó el cultivar de ajo, Criollo 15. Con vistas a trabajar a partir de material libre de virus o al menos reducir su concentración, los dientes fueron esterilizados con 70% etanol por 30 seg., 0.1% solución del hipoclorito de sodio con 2 gotas de Tween 20 por 20 min. y posteriormente lavados con agua destilada estéril tres veces. Los meristemos extraídos fueron cultivados según la metodología descrita por Pérez Lezcano (2000). Los explantes utilizados en los diferentes experimentos fueron tomados de las plántulas *in vitro* obtenidas a partir de los meristemos.

b)-. Iniciación de los callos

Como explantes se utilizaron, ápices meristemáticos de yemas y raíces, segmentos de hojas y zona basal de los tallos. Estos fueron sembrados en el medio basal de Murashige y Skoog (1962) suplementado con 3% (w/v) de sacarosa, 0.8%(w/v) de agar y diferentes combinaciones hormonales de auxinas, Ácido naftalénacético (ANA) ó el 2, 4 Diclorofenolacético (2,4D) en concentraciones de 0,5; 1,0 y 2,0 mg/L) y citoquininas, Bencilamino purina (BAP), 2 Isopentenil adenina (2ip) ó la kinetina (Kin) en concentraciones de 0.3; 0.5; 1.0 y 1.5 mg/L). El pH se ajustó a 5.8 antes de agregar el agar y los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121⁰C por 20 min.; estos fueron servidos en tubos de ensayos (40 ml de medio). Se prepararon 20 tubos/variante de medio y los experimentos fueron repetidos tres veces. Estos se incubaron a 28⁰C con luz fluorescente blanca constante durante 30 días, evaluándose el tamaño, color y consistencia de los callos, así como la presencia de raíces.

c)-. Inducción de yemas

A los 30 días en el medio de iniciación, los explantes que regeneraron callos fueron transplantados al mismo medio basal suplementado con 0,1 mg de 2,4D y 5 mg de 2ip para una mayor proliferación de yemas. A los 30 días se evaluó el número de yemas por explante y los datos fueron evaluados estadísticamente por un ANOVA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I-. CARACTERIZACIÓN CITOGENÉTICA

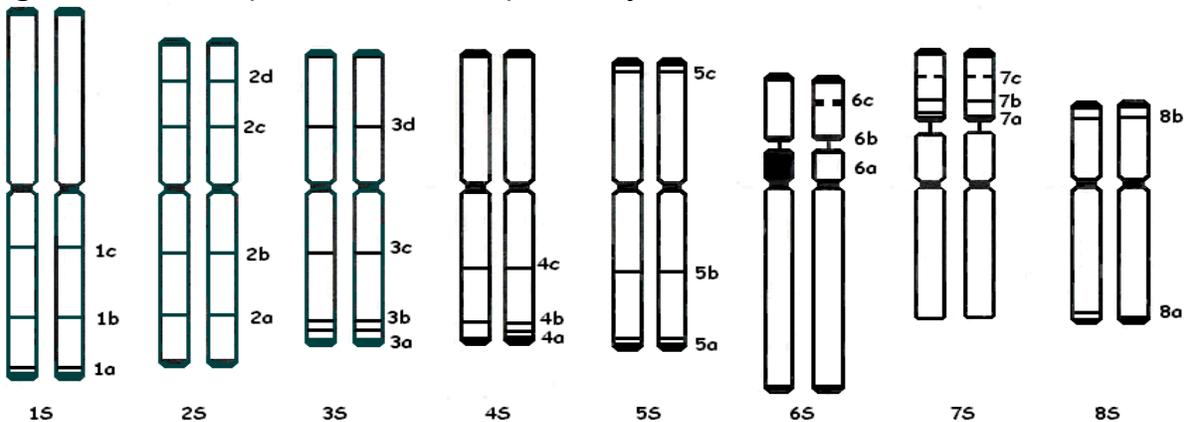
a)-. Patrón general de Bandas C

Los patrones de bandas C revelan los mismos tipos de bandas para todos los clones estudiados (centroméricas, teloméricas, intercaladas y NORs). Las bandas más distintivas son las centroméricas, siempre presentes en todos los cromosomas y clones; así como las ubicadas en las constricciones secundarias (NORs). La mayoría de las bandas intercaladas son pequeñas pero de gran intensidad y las bandas teloméricas están presentes en los extremos de casi todos los cromosomas de forma alternativa (excepto en los brazos largos de los cromosomas 1S y 7S_t). Estas características de las

distribución de la heterocromatina constitutiva (predominio de las bandas centroméricas y las bandas NORs) fue reportada para otras especies del género *Allium* sin embargo difiere de lo reportado por Vosa (1976) y Karp y col. (1992).

En la Figura 2 se observa el ideograma base de los cromosomas de ajo, mostrando el patrón de bandas C típico de esta especie. Se reflejan todas las bandas encontradas en la mayoría de las metafases estudiadas, pequeñas bandas vistas con muy poca frecuencia no fueron incluidas. Los patrones de bandas de cada par de cromosomas permiten la caracterización e identificación de los 8 pares del genoma de esta especie.

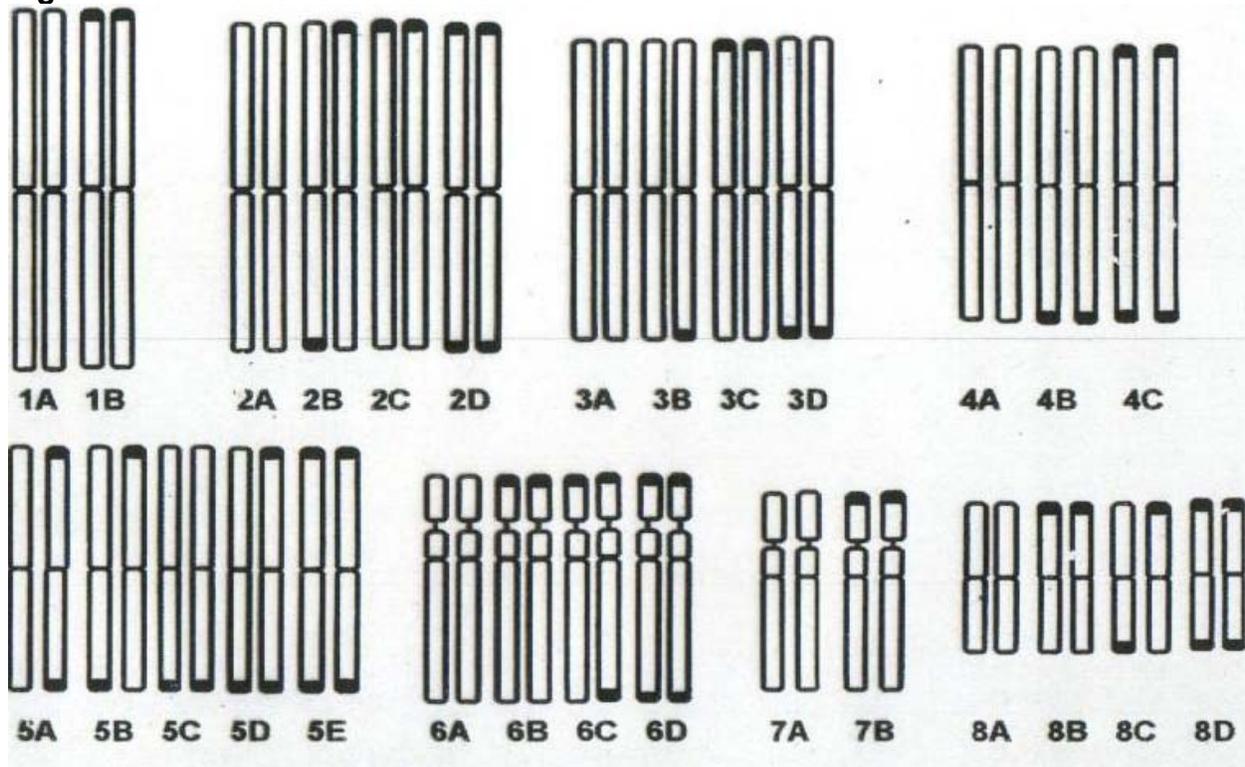
Figura 2: Patrón típico de bandas C para el ajo.



La simetría de los patrones de bandas en los cromosomas 2S en las bandas 2a y 2b, en los cromosomas 3S en las bandas 3c y 3d y en los cromosomas 5S en las bandas 5a y 5c están relacionadas también con el estilo de bandas. Patrones similares en algunos cromosomas metacéntricos ha sido encontrado con anterioridad en gran número de especies como, *Tubalghia leucantha* (Vosa, 1973), especies de *Allium* (Vosa 1976) y cebada, *Hordeum vulgare*, (Linde-Laursen, 1978), pero todavía la importancia de este fenómeno no está aún clara. Aunque se relaciona con la posición que ocupan los cromosomas en la interfase mitótica (estado de Bouque) (Schweizer y col. 1987). Como se observa, cada uno de los pares cromosómicos del ajo tiene un patrón de bandas distintivo que permite su identificación; por lo que las ventajas de la técnica de bandeado de Giemsa, para la caracterización, identificación y clasificación individual de los cromosomas, en comparación con los métodos de la citogenética tradicional que solo permite la identificación clara de 3 o 4 pares, son evidentes. A pesar de la existencia de un patrón de bandas típico para esta especie, las variaciones del mismo entre los diferentes cultivares revelan la presencia de un gran polimorfismo genético en la heterocromatina constitutiva, principalmente en la telomérica y la intercalada, no ocurriendo así con la heterocromatina centromérica la cual se mantiene invariablemente constante en todos los cariotipos estudiados.

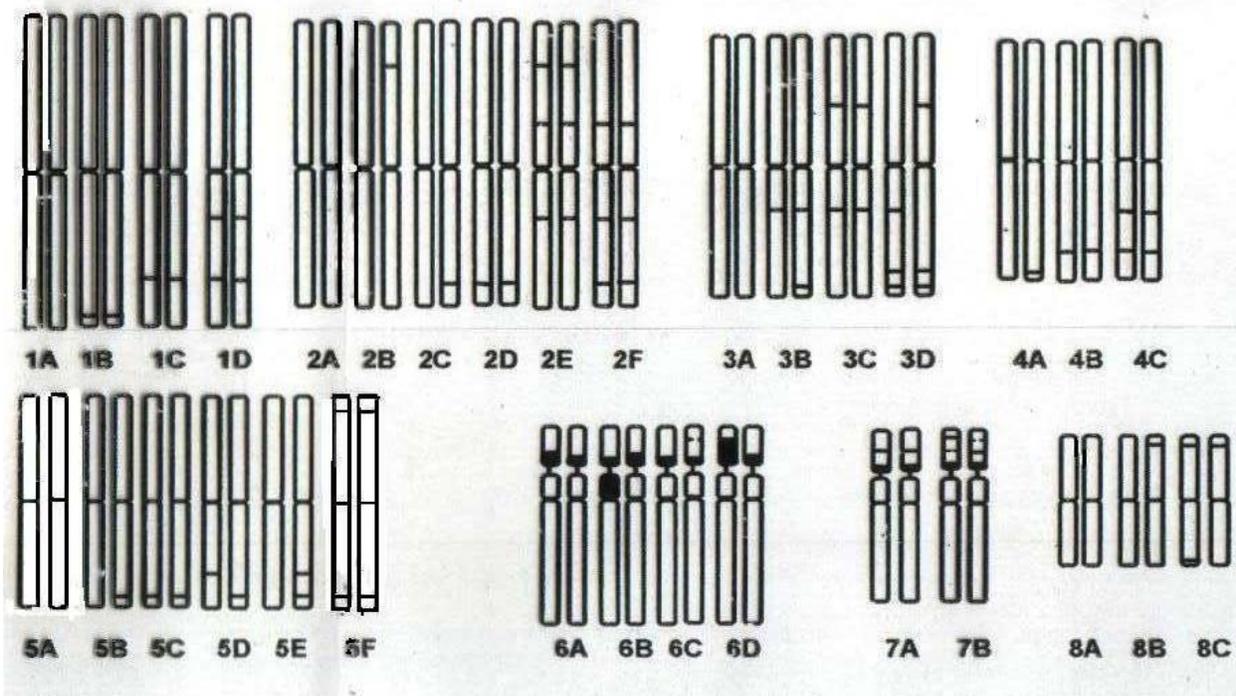
Al analizar el polimorfismo de las bandas teloméricas en los nueve cultivares estudiados (Figura 3), se observa que las 28 bandas presentan variaciones en todos los cultivares, las cuales son reflejadas más por la ausencia/presencia de las bandas que por el tamaño y forma de las mismas.

Figura 3: Polimorfismo de bandas teloméricas.



Este mismo comportamiento de las bandas teloméricas fue reportado para el *Allium shoenoprasum* por Karp y col. (1992), quien reportó polimorfismo de bandas tanto entre clones como entre cromosomas homólogos (los cromosomas 4Sh presentaron 3 bandas en uno de los homólogos mientras que el otro solo presentaba 2 y en el par de cromosomas satélites solo uno de los homólogos presentaba una banda telomérica), en otras especies del género se ha reportado también un comportamiento heterogéneo de la cromatina telomérica (Vosa, 1973; Vosa, 1976; Loidl, 1983 y Karp y col. 1992). El análisis de las bandas intercaladas y las bandas de las constricciones secundarias en los nueve clones estudiados demostró que de las 25 bandas presente, 24 mostraban polimorfismo (Figura 4). En 21 de ellas este polimorfismo fue motivado por la ausencia /presencia de las bandas y en las 3 restantes (las bandas NORs) la variación fue en el tamaño de las bandas, aunque la banda 7c presentó ambas formas de polimorfismo; además del polimorfismo de bandas entre cultivares, se presentó para 14 bandas intercaladas polimorfismo de bandas entre cromosomas homólogos, en 11 de ellas por ausencia/presencia y en 3 por forma y tamaño. El polimorfismo de las bandas intercalares y bandas NORs entre cultivares y entre cromosomas homólogos fue reportado por Maaß y Klaas (1995) y Lallemand y col. (1997). El heteromorfismo de bandas se presentó de forma desigual para los diferentes cromosomas e independiente del número de bandas presente en los mismos. Para los cromosomas 1S, 4S y 7S_t con 3 bandas intercaladas se encontraron solo tres variantes para los dos primeros y 2 para el último, mientras que para los cromosomas 2S y 5S con 4 y 3 bandas respectivamente se encontraron 6 variantes diferentes de bandeo (Figura 3 y 4).

Figura 4: Polimorfismo de bandas intercaladas y NORs.



La alta frecuencia de polimorfismo de bandas (tanto teloméricas como intercaladas) resultó en al menos dos variantes de bandeo por cada cromosoma (figuras 3 y 4), siendo los cromosomas 2S y 5S los más polimórficos con 6 variantes diferentes de bandeo intercalado y 4 y 5 variantes de bandeo telomérico respectivamente. Los cromosomas 1S y 7S_t fueron los menos polimórficos en las bandas teloméricas y en bandas intercalares el 7S_t presentó solamente 2 variantes de bandeo. El estudio del comportamiento de las bandas C nos permitió detectar, además de la presencia de un patrón de bandas C común para los 15 cultivares estudiados (representes de diferentes zonas geográficas), un similar “estilo de bandas”; tipificado por la presencia de bandas centroméricas estables y el polimorfismo de las bandas teloméricas e intercaladas, los que pueden ser utilizados para el reconocimiento de otros cultivares de ajo. Similares estilos de bandas fueron establecidos para otras especies del género *Allium* y *Hordeum* (Vosa, 1976). Otros “estilos de bandas” donde predomina la existencia de heterocromatina telomérica fueron reportados para el maíz (*Zea mays* L.) por Hadlaczky y Kálmán (1975) y Sachan y Tanaka, 1976) y para el arroz por Karp y col. (1992). Este planteamiento lo justifica el hecho de que la gama de variantes de bandeos en las nueve líneas estudiadas no impidió la identificación de un patrón base.

b)-. Caracterización de los clones a partir de los patrones de bandas C.

En la Tabla 1 se listan las diferentes variantes de bandeos (teloméricos e intercalares) para cada uno de los quince clones de ajo estudiados, como se observa cada variante de bandeo representa a un solo cultivar, lo que permite la identificación de los mismos, donde las diferencias se incrementan entre los diferentes grupos. En esta Tabla se pueden observar las bandas comunes a los cultivares de un mismo grupo, las bandas que identifican a los grupos y las que caracterizan a los clones individualmente. El grupo G₁ es caracterizado por los patrones de bandas de ambos tipos (telomérico e intercaladas del cromosoma 4S, además de las bandas intercaladas del cromosoma 6S_t

siendo a su vez los patrones de bandas del cromosoma 5S los más variables para ambos tipos de bandas. Además de estas diferencias se observa que el clon Villa Clara es identificado por un patrón de tipo C de bandas teloméricas para el cromosoma 5S. Para el grupo G_2 los patrones de bandas distintivos del grupo son el tipo B de bandas intercaladas para el cromosoma 1S y tipo D para el cromosoma 2S, así como, para el cromosoma 8S para las bandas teloméricas. Dentro del grupo se observa que los cromosomas con patrones más variables son el cromosoma 6St para las bandas intercaladas y los cromosomas 2S para las bandas teloméricas. El clon Limonar se identifica por los patrones de bandas intercaladas del tipo C en el cromosoma 6S y un patrón de bandas teloméricas del tipo D en el cromosoma 2S, mientras que el clon Cienfuegos sólo se distingue por sus patrones de bandas teloméricas en los cromosomas 6St (D). El grupo G_3 se tipifica por los patrones de bandas teloméricas en los cromosomas 1S (B) y 6St (A) y los cromosomas más variables son los cromosomas 2S y 3S para las bandas intercaladas. El clon P. del Río se diferencia del resto de los cultivares mediante los patrones de bandas intercaladas en los cromosomas 1S (D), 2S (F) y 3S (C); mientras que el Sandino lo hace sólo con los patrones de bandas intercaladas de los cromosomas 2S (E). El grupo G_4 se caracteriza por los cromosomas 2S (A) y 6St (D) de bandas intercaladas y 8S (A) de bandas telomérica, siendo los cromosomas 5S los más polimórficos para ambos tipos de bandas, además del cromosoma 2S para las bandas teloméricas.

Tabla 1: Patrones de bandas (teloméricas e intercaladas) para los clones criollos.

CLON CRIOLLO	Patrón de bandas intercaladas								Patrón de bandas teloméricas							
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
G_1																
Cifuentes	A	C	A	A	D	B	B	B	A	A	A	A	D	C	A	C
Gibara	A	C	B	A	E	B	B	B	A	A	B	A	B	B	A	B
Villa Clara	A	B	A	A	B	B	B	C	A	A	A	A	<u>A</u>	C	A	B
Guadalupe	A	C	A	A	E	B	B	B	A	A	B	A	B	B	A	B
IRM-2	A	B	B	A	E	B	B	C	A	A	A	A	B	B	A	C
G_2																
Limonar	B	D	A	C	C	<u>C</u>	B	A	A	<u>D</u>	A	C	E	B	A	D
Cienfuegos	B	D	A	C	C	A	B	A	A	B	A	B	E	<u>D</u>	B	D
Sancti Spíritus 3	B	D	B	C	C	B	B	A	A	A	A	C	E	B	B	D
G_3																
Pinar del Río	<u>D</u>	<u>F</u>	<u>C</u>	C	C	A	B	A	B	A	D	B	E	A	A	B
Sandino	C	<u>E</u>	A	B	C	A	B	A	B	A	A	B	E	A	A	B
Criollo 15	C	C	B	C	C	A	B	A	B	A	D	B	E	A	A	B
G_4																
Martínez Liliana	A	A	A	B	<u>A</u>	D	A	A	A	A	<u>C</u>	B	<u>C</u>	B	A	A
Martínez INIFAT	A	A	D	B	<u>F</u>	D	A	A	A	<u>C</u>	A	B	E	B	A	A
México 14	A	A	D	B	B	D	A	B	A	B	A	B	D	B	A	A
G_5																
Viet Nam	C	G	E	C	D	D	B	B	A	A	A	A	B	C	A	C

A Bandas distintivas del grupo. A Bandas distintivas del clon.

El clon Martínez de la Liliana se caracteriza por un patrón de bandas intercaladas en los cromosomas 5S (A) y en los 3S (C) y 5S (C) para las bandas teloméricas; mientras que el Martínez del INIFAT presenta como bandas distintivas los patrones de bandas intercaladas para los cromosomas 5S (F) y 2S (C) para las bandas teloméricas. Sin embargo el patrón de bandas C del clon Viet Nam no responde a ninguno de los grupos propuestos, por lo que pudiera proponer un nuevo grupo con un patrón de bandas intercaladas diferente en los cromosomas 2S y 3S incrementando el polimorfismo de bandas de esos cromosomas al aportar dos nuevas variantes de bandeos en las bandas 2d y 3b. Es bueno aclarar que este polimorfismo no está relacionado con la presencia de nuevas bandas sino con el comportamiento diferente de estas dos. Además de las bandas típicas de cada grupo se pueden observar bandas comunes para varios grupos, como el patrón de bandas 7S (B) y 8S (A) para las bandas intercaladas y 1S (A) y 7S (A) para las bandas teloméricas, entre otras. Resultados similares fueron obtenidos por Linde-Laursen (1975) en cebada.

II.- AMPLIACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA Y CORRELACIÓN DE LOS CARACTERES CITOGENÉTICOS Y MORFOAGRONÓMICOS.

En la Tabla 2 se detallan los clones prospectados en los viajes realizados y en la Figura 1, las zonas de colectas visitadas y el número de clones prospectados en cada zona.

Tabla 2: Cultivares prospectados.

No	Prospección	Cultivar	Procedencia
1	PA- 1	Viet Nam	Viet Nam
2	PA-2	Criollo	Cuba, Sancti Spíritus Central O. Morales
3	PA-3	Criollo	Cuba, Cifuentes, Villa Clara.
4	PA-4	Criollo	Cuba, Sancti Spíritus
5	PA-5	Criollo	Cuba, Encrucijada, Santa Clara
6	PA- 6	Criollo	Cuba, Cienfuegos, Aguada de pasajeros
7	PA-7	Criollo	Cuba, Ciego de Ávila, Zona de Santa Ana.
8	PA-8	Criollo	Cuba, Pinar del Río, el Naranjo, Km 6 M. de Matahambres
9	PA-9	Criollo	Cuba, Holguín Velasco, Gibara
10	PA-10	IRM-2*	Cuba, INIFAT *Mejorados o obtenidos en el INIFAT
11	PA- 11	Fiandor	Cuba, Guira de Melena, Habana
12	PA-12	Criollo	Cuba, Pinar del Río, sabanilla
13	PA-13	Criollo	Cuba, Sancti Spíritus, Fomento
14	PA-14	Criollo	Cuba, Sancti Spíritus Caserío Ceibabo
15	PA-15	Criollo	Cuba, Holguín, La púa, Gibara
16	PA- 16	Criollo	Cuba, Matanza, Jagüey Grande, Manguito
17	PA-17	Criollo	Cuba, Cienfuegos
18	PA-18	Criollo	Cuba, Matanza, Km 5 Colón a Banaqueses
19	PA-19	Criollo	Cuba, Encrucijada, Santa Clara
20	PA-20	Criollo	Cuba, Pinar del Río, La grifa
21	PA- 21	Rosquete	Cuba, Guira de Melena, Habana
22	PA-22	Sancti Spiritus 3*	Cuba, INIFAT *Mejorados o obtenidos en el INIFAT
23	PA-23	Criollo	Cuba, Cienfuegos, Quesada, Carretera a Rancho Luna
24	PA-24	Guadalupe 15*	Cuba, INIFAT *Mejorados o obtenidos en el INIFAT

La primera colecta se realizó a la provincia de Pinar del Río en junio del 2001 y se colectaron 3 clones en la zona de El naranjo, la Grifa y Sabanilla respectivamente. En la segunda colecta, realizada en el mismo periodo a las provincias habaneras y Matanzas, se colectaron 4 clones criollos en las provincias Habana y Matanzas y se incluyeron los 3 clones mejorados por el INIFAT (Guadalupe 15, Sancti Spíritus-3 y IRM-2) y el clon vietnamita. El tercer viaje de colecta se realizó en agosto del 2001 a las provincias centrales donde se prospectó la mayor cantidad de clones con 11 prospecciones realizadas, el cuarto viaje de prospección se realizó en julio del 2002 a la zona oriental (Provincia de Holguín) y se colectaron 2 nuevos clones criollos. Como se puede observar la mayor cantidad de clones criollos se colectaron en la zona central de donde procede el 45.83% de los clones de la colección actual y el 55% de los clones criollos prospectados en el proyecto. La región central del país es una zona importante en la producción de especie, por las condiciones de suelo, temperatura y precipitaciones favorables para el desarrollo fisiológico de esta especie.

Estas prospecciones permitieron constatar una disminución en el número de campesinos que cultivan el ajo en las diferentes regiones visitadas (de todas las fincas visitadas solo se logró colectar en el 35.0% de ellas). Las causas de esta disminución están dadas por los altos requerimientos de agua y fertilizantes de este cultivo, lo que encarece su producción, por lo que en muchos casos su cultivo se limita a pequeñas producciones para autoconsumo en áreas cercanas a la vivienda. Esto influyó negativamente en el número de clones colectados si se compara con las colectas realizadas en la década de los 80; aunque los estudios de caracterización realizados a esta colección arrojaron que existe una gran variabilidad genética, por lo que podemos plantear que esta situación no influyó negativamente en la variabilidad infraespecífica existente en esta especie.

En la Tabla 3 se muestran las correlaciones entre los caracteres morfo-agronómicos y los citogenéticos. Se observó que los caracteres citogenéticos índice de asimetría inter cromosómica (A_2), índice de homología del par cromosómico $6S_t$ ($6LT_2/6LT_1$), los índices centroméricos de los dos homólogos del par $7S_t$ ($7IC_1$ y $7IC_2$), además de los índices de satélite de este par cromosómico son los que más correlacionaron con los caracteres relacionados con el diente (número (ND), altura (AD), diámetro (DD) y relación altura/diámetro (AD/DD)). Sin embargo, los caracteres citogenéticos estudiados no tuvieron ninguna correlación directa con los caracteres relacionados con el bulbo, la planta o las hojas. El índice de asimetría inter cromosómica (A_1) y el índice centromérico de ambos homólogos del par $7S_t$ ($7IC_1$ y $7IC_2$) fueron los caracteres cromosómicos que presentaron correlaciones positivas más relevantes con los caracteres del diente, excepto para la relación altura/diámetro donde la correlación fue negativa (- 0.646) en el homólogo 2 y no correlacionó con el homólogo 1. Para el cromosoma $6S_t$ las correlaciones fueron menos marcadas e inversas entre el índice de homología ($6LT_2/6LT_1$) y el número y altura de los dientes y directas entre el índice centromérico del homólogo 2 y los parámetros del diente antes mencionados. Los caracteres citogenéticos relacionados con el cromosoma $8S$, así como con los satélites y el índice de asimetría intra-cromosómica no tuvieron correlación alguna con los caracteres agromorfológicos estudiados.

A partir de estos resultados se puede inferir que a medida que el cariotipo se hace más asimétrico por las diferencias en la longitud individual de los cromosomas y mientras más metacéntrico sean los homólogos del par $7S_t$, mayores serán los valores que se

pueden obtener en los índices relacionados con los dientes de dichos cultivares. Por lo que los índices de asimetría intercromosómico y centroméricos del par 7S_t son los parámetros de mayor valor a tener en cuenta para la clasificación del ajo desde el punto de vista citogenético y a la vez se obtiene una clasificación indirecta en cuanto a las dimensiones del diente, que pueden ser de utilidad para la detección temprana de genotipos superiores en caracteres relacionados primariamente con el rendimiento.

Tabla 3: Correlaciones entre los caracteres cromosómicos y los caracteres agromorfológicos.

	A1	A2	⁶ LT1/ ⁶ LT2	6IC1	6IC2	7IC1	7IC2	8IC1	8IC2	6IS1	6IS2	7IS1	7IS2
LB	-0.14	-0.01	-0.17	0.02	0.25	-0.05	0.52	-0.18	0.03	0.10	-0.22	-0.19	-0.21
AB	-0.31	-0.21	-0.07	-0.02	0.33	-0.19	-0.21	-0.32	-0.04	0.24	-0.19	-0.10	-0.09
PB	-0.44	-0.21	-0.15	0.12	0.58	-0.04	-0.25	-0.17	0.11	0.22	-0.10	-0.13	-0.21
AP	-0.52	-0.28	0.03	0.00	0.35	-0.01	-0.06	0.00	-0.01	0.32	-0.03	0.33	0.41
NH	-0.23	-0.05	-0.02	0.08	0.16	0.16	0.55	0.11	0.04	0.24	-0.07	-0.05	-0.06
AB/DB	0.34	0.39	-0.16	0.08	-0.20	0.26	0.42	0.32	0.13	-0.28	0.00	-0.09	-0.15
PD	0.53	0.57	0.11	0.25	-0.30	0.71	0.83	-0.39	-0.51	-0.09	-0.43	-0.40	-0.06
ND	0.33	0.65	-0.51	-0.42	0.52	0.62	0.64	0.10	-0.36	0.01	-0.19	-0.02	0.40
LD	0.43	0.56	-0.54	-0.30	0.63	0.50	0.51	0.11	-0.18	0.09	-0.06	0.03	0.48
AD	0.26	0.51	0.03	-0.20	-0.01	0.63	0.81	-0.25	-0.25	-0.02	-0.31	-0.13	0.03
LD/AD	0.01	-0.23	0.36	-0.01	-0.24	0.30	-0.64	0.40	0.17	0.13	0.33	0.21	0.39
LH	-0.35	0.27	-0.39	0.25	0.50	0.37	0.29	0.30	0.18	0.03	-0.10	0.49	0.33
AH	-0.41	0.11	-0.16	0.21	0.30	0.22	0.31	0.30	0.18	0.10	0.05	0.68	0.57

De las 52 bandas utilizadas en este estudio (24 intercaladas y 28 teloméricas), sólo 18 bandas correlacionaron con los diferentes caracteres agromorfológicos, de ellas 11 intercaladas y 7 teloméricas. En la tabla 4 se muestran estos resultados, los valores obtenidos de estas correlaciones fueron altos, superiores a 0.70, en la casi totalidad de los casos. Al analizar las bandas intercaladas podemos apreciar que están representados todos los pares de cromosomas del ajo, las bandas de los cromosomas 1S, 3S y 5S correlacionaron con caracteres del bulbo como son el largo, ancho y la forma; en el resto de los cromosomas las bandas correlacionaron con los caracteres del diente, como el peso y el ancho de los mismos. Es bueno destacar que estos valores fueron negativos, lo que sugiere que la presencia de estas bandas influye negativamente en estos parámetros del diente. En el caso de las bandas teloméricas, sólo correlacionaron las bandas pertenecientes a los cromosomas 2S, 3S, 4S y 5S. Contrariamente a las bandas intercaladas, los cromosomas 2S y 4S correlacionaron con caracteres del bulbo como largo y ancho de los mismos, y los cromosomas 3S y 5S con los caracteres del diente (número, largo y ancho de los dientes).

A partir de estos resultados se puede inferir que existen bandas que tienen una relación directa con caracteres agromorfológicos importantes y que pueden ser utilizados como marcadores para estos.

Tabla 4: Correlaciones entre los caracteres agro-morfológicos y las diferentes bandas intercalas y teloméricas.

	1S	2S	3S		4S			5S	6S	7S	8S
	I-2	I-4	I-9	I-11	I-12	I-13	I-14	I-16	I-18	I-23	I-25
LB	0.13	-0.13	0.58	0.58	-0.66	0.66	0.19	-0.93	-0.13	-0.13	-0.53
AB	-0.88	-0.63	0.73	0.73	0.25	-0.25	-0.71	-0.35	0.13	0.13	0.13
PB	-0.63	0.16	0.20	0.20	0.32	-0.32	-0.45	0.00	0.16	0.16	0.16
LB/LA	0.92	0.26	0.08	0.08	-0.66	0.66	0.56	-0.19	-0.53	-0.53	-0.13
PD	0.43	0.00	0.55	0.55	-0.43	0.43	0.00	0.00	-0.87	-0.87	0.43
ND	0.00	0.00	0.45	0.45	0.00	0.00	-0.33	-0.33	0.00	0.00	0.00
LD	0.00	0.00	0.45	0.45	0.00	0.00	-0.33	-0.33	0.00	0.00	0.00
AD	-0.71	-0.71	0.45	0.45	0.71	-0.71	-1.00	0.33	0.00	0.00	0.71

	2S		3S	4S		5S	
	T-4	T-5	T-8	T-11	T-12	T-16	T-17
LB	-0.42	-0.42	0.13	0.93	0.93	0.28	0.53
AB	-0.79	-0.79	-0.13	0.35	0.35	0.35	-0.13
PB	-0.40	-0.40	0.32	0.00	0.00	0.00	-0.16
LB/LA	0.58	0.58	0.13	0.19	0.19	0.19	0.13
PD	0.55	0.55	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.43
ND	-0.45	-0.45	0.71	0.33	0.33	0.93	0.00
LD	-0.45	-0.45	0.71	0.33	0.33	0.33	0.00
AD	-0.45	-0.45	0.00	-0.33	-0.33	-0.33	-0.71

IV-. CULTIVO DE TEJIDOS.

a)-. Inducción de callos y regeneración de yemas.

Al analizar el efecto auxínico (Tabla 5) podemos observar una influencia directa de la concentración de la misma en la formación de callos, a bajas concentraciones (0,5 mg/L) la formación de callos fue casi nula en la mayoría de los tratamientos, sólo en algunos casos principalmente al combinar la Kinetina con el ANA se observó la formación de callos de tamaño pequeño y de consistencia compacta. A medida que se incrementa la concentración de las auxinas fue mayor en número de tratamientos que indujeron la formación de callos. Además, se observaron diferencias significativas entre las auxinas utilizadas, en los tratamientos donde se utilizó el 2,4D hubo una mejor respuesta organogénica y el tamaño de los callos fue mejor.

Cuando se analiza el porcentaje de callos embriogénicos (Tabla 5) se observa también grandes diferencias entre las auxinas utilizadas, el uso del 2,4D reportó un mayor porcentaje de estos callos a las diferentes concentraciones utilizadas. Como se observa en la Tabla, las citoquininas utilizadas mostraron un efecto diferenciado entre ellas y con respecto a la auxina con la que fue combinada. En los tratamientos con kinetina fue donde más inducción y formación de callos se obtuvo independiente de la auxina utilizada, sin embargo, ninguno de los tratamientos indujo callos friables. En presencia de esta hormona los callos presentaron un color verde claro y de consistencia compacta. En todos los tratamientos donde se utilizó esta citoquinina combinada con el ANA y segmentos de hojas como explante se indujo también la formación de raíces.

Tabla 5: Efecto de las auxinas en la inducción de callos.

	inducción de callos		inducción de callos embriogénicos	
	ANA	2,4 D	ANA	2,4 D
0,5	8 c	4 d	0 e	50 c
1	21 b	26 a	38 d	53 bc
2	21 b	28 a	57 b	64 a
Es	3.78		6.25	
CV	5.84		12,45	

Por su parte los tratamientos con 2ip fueron más efectivos, tanto para la inducción de callos como para la formación de callos friables, cuando se combinaron con el 2,4D (Tabla 6). En presencia de esta auxina, el 2ip indujo siempre callos friables y de color blanquecino, aunque a altas concentraciones los callos, en algunos tratamientos, se tornaban gelatinosos. En los tratamientos donde se combinan el 2ip con el ANA el crecimiento de los callos fue menor y de color amarillo claro. Los callos formados en la presencia de 2ip resultaron de mayor tamaño y produjeron mayor número de yemas (datos no mostrados). En todos los tratamientos donde se indujo la formación de callos en presencia del BAP como citoquinina se formaron callos friables, sin embargo el tamaño de los callos formados siempre fueron de menor tamaño que los obtenidos con 2ip, además en el caso del BAP los callos mostraron un color amarillo claro. Al utilizar ápices radiculares en presencia de BAP y las concentraciones más altas de las auxinas se estimuló el desarrollo de raíces en los callos formados. La respuesta organogénica de los diferentes explantes utilizados estuvo mucho más influenciada por las diferentes auxinas utilizada, que por las citoquininas (datos no mostrados).

Tabla 6: Efecto de las combinaciones hormonales en la inducción de callos.

	inducción de callos		inducción de callos embriogénicos	
	ANA	2,4 D	ANA	2,4 D
BAP	41.67	35.42	100	100
2ip	14.58	39.58	0	84
Kinetina	43.75	45.83	0	0
Es	4,68			
CV	8,76			

Como se puede observar en la Tabla 7, al utilizar segmentos de hojas como explantes en los tratamientos suplementados con 2, 4D; o ápices radiculares en los tratamientos con ANA, no se obtuvo respuesta morfogénica. Con el resto de los explantes se indujo la formación de callos independientemente de la auxina utilizada aunque el porcentaje de tratamientos que respondieron fue mayor en donde se utilizó el 2,4D como suplemento auxínico.

La influencia de las auxinas y citoquininas en la respuesta organogénica en el cultivo de ajo ha sido reportado por diferentes autores (Abo, 1977; Bhojwani, 1980; Dantu y Bhojwani, 1987; Moriconi y col. 1990; Nagakubo y col. 1993; Koch y col. 1995; Haque y col. 1997; Ayabe y Sumi, 1998; Myers y Simon, 1998; Myers y Simon, 1999). La presencia del 2,4D como suplemento auxínico en la inducción de callos ha sido la que mejores resultados ha reportado en este estudio coincidiendo con Marrero y Agramonte (1994) y López y Lara (1998). Al pasar los callos friables de los medios de inducción de

callos al medio de regeneración (0,1 mg/L de 2, 4D + 5 mg/L de 2ip) se observa una respuesta diferenciada en dependencia de la procedencia del callo.

Tabla 7: Efecto de los explantes en la inducción de callos embriogénicos.

	ANA	2,4 D
Ápice de yemas	50.00 b	52.78 b
Ápices radiculares	0.00	50.00 b
Discos basales	44.44 c	61.11 a
segmentos de hojas	27.78 d	0.00
Es	5,19	
CV	18,26	

Los callos procedentes de los ápices radiculares incubados en los tratamientos con 2,4D y 2ip fueron los que más brotes regeneraron por callos, sin embargo en los callos provenientes de los tratamientos con ANA regeneraron muy pocas yemas (Tabla 8).

Tabla 8: Regeneración de yemas a partir de los callos obtenidos.

explantes	combinaciones hormonales		
	ANA + BAP	2, 4D + BAP	2, 4D +2 ip
Ápices apicales	2.30 d	3.20 d	4.50 d
Ápices radicales	--	4.60 d	12.38 a
Tallo basal	4.10 d	6.80 c	9.67 b
Es	2,38		
CV	7,29		

A partir de los resultados obtenidos en las diferentes combinaciones hormonales y explantes se determinó que el mejor explante para la inducción de callos friables son ápices radiculares cuando se cultivan en el medio MS suplementado con 2,4D y 2ip en concentraciones de 2 mg/L y 0.3 mg/L respectivamente. La concentración de esta citoquinina sólo influyó en el crecimiento de los callos, obteniéndose los mejores resultados a bajas concentraciones (0,3 mg/L), los callos formados en estas condiciones son de color blanquecinos y friables y en ninguna de las variantes se observó la formación de raíces.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abo El-Nil, M.M. (1977): Organogenesis and embryogenesis in callus cultures of garlic (*Allium sativum* L.). Plant Sci. Lett. 9: 259–264
- Avato, P., V. Miccolis y F. Tursi (1998): Agronomic evaluation and essential oil content of garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes grown in Southern Italy. Adv Hort Sci 12(4): 201–204.
- Ayabe, M. y Sumi, S. (1998): Establishment of a novel tissue culture method, stern-disc culture, and its practical application to micro propagation of garlic (*Allium sativum* L.). Plant Cell Rep. 17: 773–779
- Batverstock, P.R. y Moritz, C. (1990): Sampling. En: Molecular Systematics. Sinauer Associates Eds., Inc. Publisher, Sunderland, Massachusetts. USA. pp.13-24.
- Bhojwani, S.S. (1980): *In vitro* propagation of garlic by shoot proliferation. Sci. Hort. 13:47-52.

- Candido, V., S. Infantino y V. Miccolis (1996): Análisis de los caracteres agronómicos de una colección de ajo (*Allium sativum* L.). In: C.I.G.M. (Eds.), 2. Congreso Nacional sobre Biodiversidad y Producciones Biológicas. Matera 11/06/1996, pp. 373–389.
- Conti, S. y A. Ferraresi (1974): Análisis biométrico de clones y procedencias de ajo en relación al mejoramiento genético de la cultura. *Riv Agr* 8(1): 47–57.
- Cornides, M. T. (1985): Inducción de mutaciones. En: Genética Vegetal y Fitomejoramiento. Cap. 14:585-633. Ed. Científico Técnico. Ciudad de la Habana.
- Dantu, P.K. y Bhojwani, S.S. (1987): *In vitro* propagation of gladiolus. *Gartenbau wissenschaft* 52: 90–93
- Escaff, M. y Cortés, I. (1995): Garlic germplasms collected in Chile. En: International Symposium on Edible Alliaceae. Mendoza, Argentina. Abstracts: 22.
- Figliuolo, G., Candido, V., Logozzo, G., Miccolis V. y Spagnoletti Zeuli, P.L. (2001): Genetic evaluation of cultivated garlic germplasm (*Allium sativum* L. and *A. ampeloprasum* L.). *Euphytica* 121: 325–334,
- Goulden, C.H. (1952): Methods of statistical analysis. John Wiley. London. 467 pp.
- Guarino L, Maxted N, Sawkins M (1998): Analysis of georeferenced data and the conservation and use of plant genetic resources. In: Greene SL & Guarino L (ed) Linking genetic resources and geography: emerging strategies for conserving and using crop biodiversity. Proceedings of a symposium. Anaheim, California, USA, 29 October, 1997 (pp 1–24). CSSA Special Publication No. 27
- Hadlaczy, G. y Kálmán, L. (1975): Discrimination of homologous chromosomes of maize with Giemsa staining. *Heredity*, 35:371-374.
- Haque M.S., Wada, T. y Hattori, K. (1997): High frequency shoot regeneration and plantlets formation from root tip of garlic. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 50: 83–89
- Hodgkin T, Roviglioni R, de Vicente MC & Dudnik N (2001): Molecular methods in the conservation and use of plant genetic resources. *Acta Horticulturae*
- IBPGR (1990): Directory crop germoplasm collections. (4) Vegetable. E. Bettencourt y J. Konopka eds. Roma, Italia.
- Kim, E.K., Hahn, E.J., Murthy, H.N. y Paek, K.Y. (2003): High frequency of shoot multiplication and bulblet formation of garlic in liquid cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73: 231–236
- Koch, M., Tanami, Z. y Salomon, R. (1995): Improved regeneration of shoots from garlic callus. *HortScience* 30: 378
- Koul, A.K. Gohil, N.R. y Langer, A. (1979) : Prospects of breeding improved garlic in the light of its genetic and breeding system. *Euphytica* 28:457-464.
- Lallemand, J. Messian C.M., F. Briand y T. Etoh (1997): Delimitation of varietal groups in garlic (*Allium sativum* L.) by morphological, physiological and biochemical characters. In: J.L. Burba & C.R. Galmarini (Eds.), Proc. I Int. Symp. Edible Alliaceae, *Acta Hort* 433: 123–132.
- Linacero, R. y Vazquez, A.W. (1992) Cytogenetic variation in rye regenerated plants and their progenies. *Genome* 35: 428–430
- Linde-Laursen, I. (1975): Giemsa C-banding of the chromosomes of “Emir” barley. *Hereditas*, 81:285-289.
- Linde-Laursen, I. (1978): Giemsa C-banding of barley chromosomes. I-. Banding patterns polymorphism. *Hereditas*, 88:55-64.
- Linde-Laursen, I. y Bothmer, R. Von (1984): Giemsa C-banded karyotypes of two subspecies of *Hordeum brevisubulatum* from China. *Plant Syst. Evol.*, 145:259-267.

- Loidl, J. (1983) citado por Schweizer, D. y col., (1987): A model for heterochromatin dispersion and the evolution of C-band patterns. *Chromosomes today*. 9:61-74
- López, P. y M. Lara. (1998): Inducción de embriogénesis somática y organogénesis de variedades mexicanas de cebolla (*Allium cepa*). En: III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Sección Cultivo de Tejidos. Resumen, — p. 147-148.
- Maaß, H.I. y M. Klaas, 1995: Intraspecific differentiation of garlic (*Allium sativum* L.) by isozyme and RAPD markers. *Theor Appl Genet* 91: 89–97.
- Marrero, D. y D. Agramante (1994): Obtención de plantas de ajo (*Allium sativum* L.) a partir del cultivo de callos. *Cultivos Tropicales* 15 (3): 97.
- MINAG (1983): Instructivo técnico del cultivo del ajo. La Habana. Dirección de Cultivos Varios, 40 pp.
- Moreno, V. (1995): La variabilidad genética de los ajos criollos. Comunicación personal.
- Moreno, V. (2003): Caracterización y conservación del germoplasma de ajo en Cuba. Comunicación personal. INIFAT
- Moriconi, D.N., Conci, V.C. y Nome, S.F. (1990): Rapid multiplication of garlic (*Allium sativum* L.) *in vitro*. *Phyton* 51: 145–151
- Muñoz de Con, Laura (2003): Mejoramiento genético del ajo. Comunicación personal. INIFAT
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473–497
- Myers, J.M. y Simon, P.W. (1998): Continuous callus production and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) using root segments from shoot-tip-derived plantlets. *Plant Cell Rep.* 17: 726–730
- Myers, J.M. y Simon, P.W. (1999): Regeneration of garlic callus affected by clonal variation, plant growth regulators and culture over time. *Plant Cell Rep.* 19: 32–36
- Nagakubo, T., Nagasawa, A. y Ohkawa, H. (1993): Micropropagation of garlic through *in vitro* bulblet formation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 32: 175–183
- Pérez Lezcano, A. (2000): Aspectos del cultivo *in vitro* en el ajo: establecimiento, multiplicación y bulbificación. En: Proyecto crioconservación de cultivos de reproducción vegetativa para el desarrollo de colecciones principales. CITMA 300043, INIFAT, Cuba. 107 p.
- Sachan, J.K.S. y Tanaka, R. (1976): A banding method for *Zea* chromosomes. *Jap. J. Genet.*, 51:139-141.
- Schwarzacher, T; Ambros, P. y Schweizer, D. (1980): Application of Giemsa banding and evolution in *Anacyclus*. *Plant Syst. Evol.*, 126:107-148.
- Schweizer, D; Loidl, J. y Hamilton, B. (1987): Heterochromatin and the phenomenon of chromosome banding. En: Results and Problems in Cell Differentiation.
- Vosa, C.G. (1973): Heterochromatin recognition and analysis of chromosomes variation in *Scilla sibirica*. *Chromosoma*, 43:269-278.
- Vosa, C.G. (1976): Heterochromatic patterns in *Allium*. I-.The relationship between the species of the *cepa* group and its allies. *Heredity*, 36:383-392.