

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE SIETE CLONES DE AJO (*Allium sativum* L.) MEDIANTE LA TÉCNICA RAPD

Adriana Pardo¹, Alexander Hernández² y Nailleth Méndez²

RESUMEN

El ajo es una especie ampliamente cultivada por sus cualidades culinarias y farmacológicas; sin embargo, su forma de reproducción asexual o apomítica ha dificultado la producción de semillas certificadas, por lo que los productores hacen uso de los dientes o bulbos de procedencia desconocida como única forma de propagación comercial del cultivo. Debido a ello, se hace necesario caracterizar los genotipos utilizados para determinar la variabilidad y base genética de los mismos con el fin de conformar un banco de germoplasma y dar inicio a programas de mejoramiento genético que conlleven a la producción de semillas certificadas para uso comercial. Esta investigación estableció como objetivo estandarizar un protocolo para la caracterización de siete clones de ajo procedentes de zonas productoras de los estados Lara y Trujillo, mediante marcadores morfológicos y moleculares (RAPD). Se empleó un análisis de agrupamiento UPGMA con su respectivo dendrograma, así como también el análisis de coordenadas principales. El análisis molecular diferenció a los clones evaluados en tres grupos. En el grupo I se ubicaron los clones colectados en las localidades 'Agua Negra' (AN-1, AN-2) y 'El Páramo' (PAL-1, PAL-2); el grupo II se conformó por los clones colectados en 'Bojó' (BO-1) y 'Cubiro' (CUB-1), mientras que en el grupo III se ubicó el clon UCLA-1 colectado en Carache, estado Trujillo. Los resultados sugieren que los clones AN-1 y AN-2, con idéntico perfil electroforético, constituyen un mismo genotipo; sin embargo, han sido distribuidos y sembrados por los productores como materiales distintos. Los clones PAL-1, PAL-2, CUB-1 y BO-1 muestran un valor de 83 % de similitud entre ellos, pero se diferencian en su comportamiento agronómico probablemente debido a la influencia de factores ambientales.

Palabras clave adicionales: Biotecnología, marcadores RAPD, propagación de plantas, UPGMA

ABSTRACT

Molecular characterization of seven garlic clones (*Allium sativum* L.) revealed by RAPD markers

Garlic is widely grown by its culinary and pharmacological applications; however, its asexual or apomictic reproduction makes seed certification to be difficult, and consequently, growers use bulbils or cloves with unknown origin for commercial propagation. In consideration, characterization of the genotypes used by growers is needed to determine their variability and genetic basis and thus create a germplasm bank and to initiate breeding programs to produce certificated seeds for commercial use. This study aims to standardize a protocol for molecular characterization in seven garlic clones from producer areas of Lara and Trujillo States, by using morphologic and molecular (RAPD) markers. A grouping UPGMA analysis was used with a dendrogram besides principal components analysis. The RAPD analysis separated the clones in three groups: Group I included those clones collected in 'Agua Negra' (AN-1 and AN-2), and 'El Páramo' (PAL-1 and PAL-2); in Group II clones from 'Bojó' (BO-1) and 'Cubiro' (CUB-1), and in Group III the clone UCLA-1 from Carache, Trujillo State. Results suggested that clones AN-1 and AN-2, showing identical electrophoretic profiles, constitute a similar genotype but they have been distributed and grown as different materials by growers. Clones PAL-1, PAL-2, CUB-1 and BO-1 showed 83 % similarity, although their agronomical performance is different probably due to environmental factors influence.

Additional key words: Biotechnology, RAPD technique, plant propagation, UPGMA

INTRODUCCIÓN

En Venezuela, el ajo representa un producto ampliamente utilizado en condiciones frescas para la elaboración de comidas y salsas, así como en

procesamiento industrial para la preparación de fármacos y condimentos. Sin embargo, aún cuando es considerado un cultivo rentable debido a los altos precios en el mercado, en el país su producción ha disminuido notablemente siendo la

Recibido: Mayo 29, 2008

Aceptado: Abril 30, 2009

¹ Dpto. de Genética, Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". e-mail: apardo@ucla.edu.ve

² Posgrados de Agronomía, Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Apdo. 400. Barquisimeto, Venezuela. e-mail: ahernandez@ucla.edu.ve; naillethmendez@ucla.edu.ve

carencia de semillas certificadas para la siembra una de las principales causas (Pardo y Marín, 2003). Al respecto, cabe destacar que la forma de propagación asexual o estrictamente apomítica del ajo, ha dificultado la producción de semillas certificadas, por lo que los productores hacen uso de los dientes o bulbos de procedencia desconocida como única forma de propagación comercial del cultivo.

Dado lo anteriormente mencionado, se hace necesario evaluar y/o caracterizar los genotipos comúnmente utilizados por los productores para la siembra, de modo de determinar la variabilidad y base genética de los mismos con el fin de conformar un banco de germoplasma y dar inicio a programas de mejoramiento genético que conlleven a la producción de semillas certificadas para uso comercial.

Para determinar las variaciones en el genoma de *A. sativum* se han empleado descriptores de diversa índole como son: los marcadores morfológicos incluyen la evaluación de características agronómicas de la planta (Nóvak, 1980; Pardo y Marín, 2003; Messiaen, 1994), los fisiológicos, que incluyen variaciones en procesos fisiológicos (Maass y Klass, 1995), los citogenéticos que implican la descripción del cariotipo (Al-Zahim et al., 1999), y los isoenzimáticos que pueden medir los niveles de variación genética entre y dentro de las poblaciones (Maass y Klass, 1995; Patena et al., 1996; Molina, 2003). Sin embargo, estos descriptores pueden presentar algunas desventajas como estar sujetos a cambios ambientales que en un determinado momento pueden modificar la expresión de un genotipo, o no revelan las alteraciones en sitios específicos o rearrreglos en los cromosomas (Rout et al., 1998), o presentar bajo nivel de polimorfismo y no puedan reflejar los cambios genéticos que ocurren en el ADN (Becerra y Paredes, 1999).

A partir de los avances de la biotecnología, se han generado una serie de técnicas con marcadores moleculares, que permiten identificar las variaciones o polimorfismos por diferencias en la secuencia del ADN (Bradley et al., 1996; Al-Zahim et al., 1997; Peiwen et al., 2001). Tales marcadores no son afectados por el ambiente, ni requieren de procedimientos complicados para su ejecución e interpretación (Arus, 2000; Khan y Spoor, 2001), a la vez que permiten identificar las

entradas únicas u otras fuentes genéticamente diversas (Gupta y Varshney, 2001; Rao, 2004). Dentro de éstos, los RAPD han detectado con exactitud la variación existente en muchas de las especies de la familia *Alliaceae* (Maass y Klass, 1995; Al-Zahim, 1999; Bradley et al., 2001).

La presente investigación se planteó con el objetivo de estandarizar un protocolo mediante la técnica RAPD para la caracterización molecular del ajo, utilizando siete clones procedentes de zonas productoras de los estados Lara y Trujillo, en Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material experimental consistió en siete clones de ajo colectados en zonas productoras de hortalizas con altitudes entre 1200 y 1500 msnm, precipitaciones entre 650 y 1.300 mm y temperaturas de 12 a 22 °C. Las localidades fueron El Páramo (clones PAL-1 y PAL-2) y Agua Negra (clones AN-1 y AN-2), ambas ubicadas hacia las coordenadas geográficas 9° 50' N y 69° 30' W; Cubiro (clon CUB-1) y Bojó (clon BO-1), ambas ubicadas hacia 9° 45' N y 69° 35' W, y la población de Carache (clon UCLA-1) en las coordenadas 9° 22' N y 70° 30' W. Las cuatro primeras localidades pertenecen al estado Lara, y la última a Trujillo. Luego de la colecta, los clones fueron plantados en forma manual en la localidad de Cubiro.

Para realizar la caracterización morfológica e se estableció un diseño de bloques al azar con tres repeticiones y siete tratamientos, para un total de 21 unidades experimentales. La unidad experimental consistió de parcelas de tres hileras de 1 m de largo separadas entre sí a 30 cm con una distancia entre plantas de 5 cm. La unidad de muestreo consistió de 10 plantas seleccionadas al azar en cada unidad experimental.

Las variables analizadas fueron:

- Altura de planta: longitud desde la superficie del suelo hasta el ápice de la hoja más alta
- Número de hojas de la planta
- Diámetro del bulbo medido en la parte media
- Peso del bulbo

Los datos fueron examinados mediante análisis de varianza, luego de comprobados los supuestos para el análisis, y se usó la prueba de Tukey para la comparación de medias usando los paquetes estadísticos NTSYS-pc 1.7 y SAS JMP 5.0.

El análisis para la caracterización molecular se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de los Posgrados de Agronomía de la Universidad Centrocidental "Lisandro Alvarado" (UCLA), en Tarabana, estado Lara, Venezuela.

Para la estandarización de la técnica RAPD se siguieron los pasos correspondientes a la extracción de ADN, la amplificación del ADN polimórfico y la visualización de las bandas generadas, tal como se describe a continuación:

- Se tomaron muestras de cinco grelos de cada genotipo y se aplicó el método de purificación con bromuro de cetiltrimetilamonio (método CTAB) descrito por Doyle y Doyle (1999). Esto permitió extraer cantidades suficientes de ADN de buena calidad.

- Se seleccionó una muestra compuesta de ADN extraído de cada uno de los siete clones evaluados y se aplicó el protocolo para RAPD descrito por Williams et al. (1990). Las condiciones más apropiadas para la amplificación de los RAPD incluyeron Tampon Promega 1X, 3 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP's, 0,001 µg Gelatina, 0,25 µM iniciador, 2,5 U Taq Promega y 20 ng de ADN en un volumen final de 15 µL. La PCR fue realizada en un termociclador Perkin Elmer 2400, programado para un primer ciclo térmico de 1 min a 93°C, seguido por 45 ciclos correspondientes a la desnaturalización (1 min a 93 °C), alineación del iniciador (36 °C por 1 min) y elongación (72°C por 1 minuto). Posteriormente, el producto se mantuvo constante a 72 °C por 5 min y luego fue conservado a 4 °C hasta la realización de la electroforesis. Para la amplificación del ADN se emplearon 11 iniciadores de la serie Operon, de acuerdo a lo reportado en *A. sativum* por Maass y Klass (1995) y Al-Zahim et al. (1999). Los iniciadores empleados fueron OPA-01, OPA-02, OPA-10, OPB-01, OPB-05, OPK-01, OPL-01, OPJ-01, OPG-01, OPE-01 y OPF-02. Con la finalidad de seleccionar los iniciadores que permitieran detectar polimorfismo, se utilizaron cinco muestras seleccionadas al azar de cada uno de los clones evaluados. Se realizaron dos repeticiones para la PCR. Se observó una alta reproducibilidad para todos los iniciadores; sin embargo, los de mejor resolución fueron los iniciadores OPA-10, OPB-01, OPJ-01 y OPK-01.

- Se logró la visualización de los fragmentos amplificados en geles de agarosa al 2 %, buffer TAE (40 mM Tris-acetato, 1mM EDTA, pH 8,0),

teñidos con 2 µL de azul bromofenol, evidenciándose la presencia de bandas comprendidas entre 300 y 2500 pb.

Para el análisis de los datos se registraron los productos de amplificación polimórficos en matrices binarias de datos, asignando (0) para ausencia y (1) para presencia de bandas amplificadas. Se construyó una matriz de similitud generada mediante el modelo matemático o índice de Jaccard (J) y con ésta, un análisis de agrupamiento UPGMA con su respectivo dendrograma. Así mismo, se aplicó el análisis de coordenadas principales. Ambos tipos de análisis permitieron visualizar las relaciones genéticas entre los clones evaluados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con los iniciadores OPA-10, OPB-01 y OPJ-01 se observaron 9 bandas, con un tamaño comprendido entre los 300 a 2000 pb, mientras que con el iniciador OPK-01 se revelaron 15 bandas entre los 500 a 2500 pb (Cuadro 1). El iniciador OPA-10 mostró polimorfismo entre los clones PAL-2, CUB-1, BO-1 y UCLA-1, mientras que los clones PAL-1, AN-1 y AN-2 presentaron idéntico perfil electroforético. Con el iniciador OPB-01 los clones PAL-1, CUB-1, BO-1 y UCLA-1 mostraron las mismas bandas, al igual que los clones PAL-2, AN-1 y AN-2. Con el iniciador OPJ-01 todos los clones, a excepción de UCLA-1, presentaron idéntico perfil electroforético. Finalmente, con el iniciador OPK-01 se evidenció el mayor número de bandas, diferenciándose todos los clones a nivel molecular.

Similar a los resultados obtenidos, en las investigaciones realizadas en ajo por Maass y Klass (1995) y Etoh y Hong (2001), el tamaño de los fragmentos amplificados osciló entre 400 a 3000 pb, con un promedio de 10 bandas por iniciador. Así mismo, en el estudio con marcadores RAPD realizado por Peiwen et al. (2001), el empleo de cinco iniciadores fue suficiente para identificar 31 cultivares de *A. sativum*.

El dendrograma obtenido basado en los coeficientes de similitud de Jaccard, conformó tres grupos (Figura 1). En el grupo I, se ubicaron los clones PAL-1, PAL-2, AN-1 y AN-2 con una similitud de 0,92. El grupo II, incluyó a los clones

CUB-1 y BO-1 con 0,90 de similitud, mientras que el grupo III se conformó por el clon UCLA-1

con una disimilitud de 0,28 con respecto a los grupos anteriores.

Cuadro 1. Número de bandas observadas en siete clones de ajo revelados por marcadores RAPD.

Iniciador	Número de bandas observadas							Total
	PAL-1	PAL-2	AN-1	AN-2	CUB-1	BO-1	UCLA-1	
OPA-10	7	8	7	7	9	8	8	9
OPB-01	8	9	9	9	8	8	8	9
OPJ-01	9	9	9	9	9	9	4	9
OPK-01	9	9	9	7	7	9	11	15

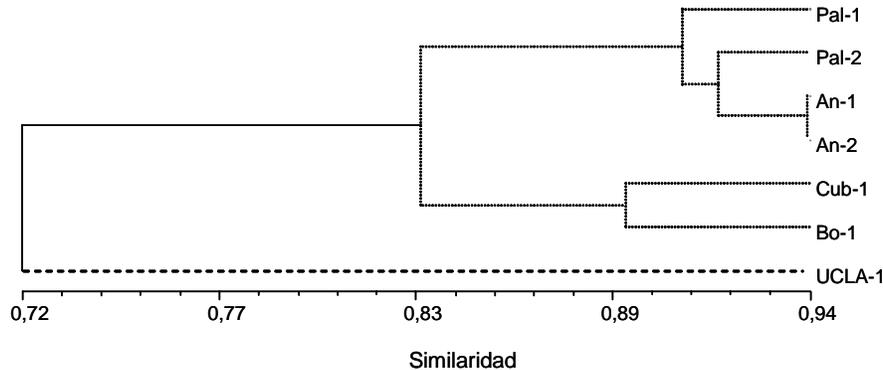


Figura 1. Dendrograma obtenido mediante el algoritmo de UPGMA de los coeficientes de similitud de Jaccard con datos de marcadores RAPD en siete clones de ajo

En forma similar al dendrograma, la representación gráfica de las coordenadas principales diferenció los mismos tres grupos (Figura 2). En un primer grupo (I) se concentraron los clones PAL-1, PAL-2, AN-1 y AN-2. En un segundo grupo se ubicaron los clones CUB-1 y BO-1; mientras que en un plano opuesto a los anteriores se ubicó el clon UCLA-1 (grupo III).

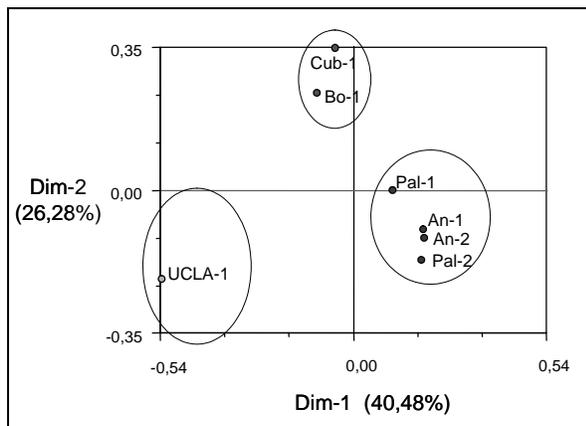


Figura 2. Representación gráfica del análisis de coordenadas principales con datos de marcadores RAPD en siete clones de ajo

El grupo I se conformó por clones colectados en las localidades de El Páramo y Agua Negra, ambas zonas comprendidas en coordenadas geográficas similares. Así mismo, en el grupo II se ubicaron los genotipos de Cubiro y Bojón, poblaciones también muy cercanas entre sí; mientras que en el grupo III quedó ubicado el único clon colectado en la población de Carache, estado Trujillo (UCLA-1).

Los resultados obtenidos por el análisis RAPD, permiten sugerir que los clones ubicados en zonas geográficamente cercanas presentan idéntico perfil electroforético por cuanto constituyen un mismo genotipo o clon; sin embargo, han sido distribuidos o sembrados por los productores de la zona como materiales distintos, como es el caso de los clones colectados en las localidades de Agua Negra (AN-1 y AN-2) y El Páramo (PAL-1 y PAL-2). Los resultados obtenidos confirman lo reportado por Etoh y Hong (2001), Bradley et al. (2001) y Peiwen et al. (2001) sobre la efectividad de los marcadores RAPD para identificar diversas entradas o colecciones de *A. sativum*; ya que el análisis logró detectar la similitud entre los clones mencionados.

En relación a las características morfológicas, el clon UCLA-1 (grupo III) destacó del resto de los materiales por presentar los mayores valores para las características relacionadas con el bulbo y el follaje (Cuadro 2). Los clones AN-2 y AN-1 (grupo I), con idéntico perfil electroforético (Figura 1), mostraron diferencias morfológicas, ya que AN-2 mostró en comparación con AN-1, altos promedios para altura de plantas y número de hojas y para las características del bulbo como

peso y diámetro (Cuadro 2). Similar a estos resultados, los clones PAL-2 y PAL-1, presentaron diferencias estadísticas para las variables altura, número de hojas y diámetro del bulbo; mientras que los clones CUB-1 y BO-1 (grupo II) localizados en zonas agrícolas geográficamente cercanas no mostraron diferencias estadísticas en las características relacionadas al follaje, pero sí entre las variables relacionadas con el rendimiento.

Cuadro 2. Características del follaje y del bulbo de siete clones de ajo, evaluados a los 120 días bajo condiciones de campo (localidad de Cubiro, estado Lara)

Clon	Características del follaje		Características del bulbo	
	Altura de planta (cm)	Número hojas	Diámetro (cm)	Peso de bulbo (g)
UCLA-1	54,70 a	8,21 a	3,64 a	13,89 a
AN-2	54,62 a	8,08 a	3,31 bc	10,93 bc
CUB-1	51,24 ab	8,04 ab	3,29 bc	11,26 bc
BO-1	49,11 ab	7,93 ab	3,49 ab	12,73 ab
AN-1	48,84 b	7,60 ab	3,07 c	9,42 cd
PAL-2	47,13 b	7,80 ab	3,08 c	7,91 d
PAL-1	50,65 ab	7,20 b	2,74 d	7,05 d
CV (%)	17,7	17,4	13,2	33,3

Estudios previos realizados en ajo por Etoh y Hong (2001) y Bradley et al. (2001), indican que los cultivares de *A. sativum*, a pesar de su esterilidad o condición apomítica, muestran gran variabilidad en sus caracteres morfológicos, especialmente en aquellos relacionados con el tamaño y número de dientes por bulbo.

En relación al comportamiento agronómico, la variabilidad observada, puede ser atribuida a diversos factores asociados a la fuerte presión de selección a la cual han sido sometidos estos materiales durante su domesticación (Etoh y Hong, 2001), cambios por mutaciones somáticas (Pooler y Simon, 1993) o infección viral (Bradley et al., 2001), o efectos ambientales (Pooler y Simon, 1993; Al-Zahim et al., 1997). A partir del uso de marcadores moleculares y morfológicos aquí descritos, se pudieron detectar similitudes y/o diferencias entre siete materiales colectados en diferentes zonas productoras de hortalizas. Dicha información será de gran utilidad para la ejecución de programas de mejoramiento genético, ya que facilitará en primer lugar, la conformación de un banco genético de la especie, y en segundo lugar la selección de genotipos superiores en base a su comportamiento agronómico y variabilidad detectada por los marcadores RAPD.

CONCLUSIONES

El análisis RAPD detectó polimorfismo entre los siete clones de ajo colectados en diferentes sitios de producción de los estados Lara y Trujillo.

La caracterización morfológica diferenció al clon UCLA-1 como el de mejor comportamiento agronómico, seguido por los clones AN-1 y AN-2 por presentar altos promedios en las variables vegetativas y las relacionadas con el rendimiento.

AGRADECIMIENTO

A Paúl Azuaje Pardo y al Sr. Beltrán Gutiérrez por su colaboración y apoyo para la ejecución de esta investigación.

LITERATURA CITADA

1. Al-Zahim, M., J. Newbury y B. Ford-Lloyd. 1997. Classification of genetic variation in garlic (*Allium sativum* L.) revealed by RAPD. HortScience 32(6): 1102-1104.
2. AL-Zahim, M.B. Ford-Lloyd y H. Newbury. 1999. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and

- cytological analysis. *Plant Cell Report.* 18: 473-477.
3. Arus, P. 2000. Molecular markers for ornamental breeding. *Acta Horticulturae* 508: 91-98.
 4. Becerra, V. y M. Paredes. 1999. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Chilena* 60(3): 270-281.
 5. Bradley, K., M. Rieger y G. Collins. 1996. Classification of Austrian garlic cultivars by DNA fingerprinting. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 36(5): 613-618.
 6. Bradley, K., M. Rieger y G. Collins. 2001. Genetic similarities of Australian garlic cultivars. *Acta Horticulturae* 555: 159-160.
 7. Etoh, T. 1986. Fertility of the garlic clones collected in Soviet Central Asia. *HortScience* 55(3): 312-319.
 8. Etoh, T. y C. Hong. 2001. RAPD Markers for fertile garlic. *Acta Horticulturae* 555: 209-212.
 9. Khan, S. y W. Spoor. 2001. Use of molecular and morphological markers as a quality control in plant tissue culture. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 4(4): 479-482.
 10. Maass, H. y M. Klass. 1995. Intraspecific differentiation of garlic (*Allium sativum* L.) by isozyme and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 91: 89-97.
 11. Messiaen, C. 1994. Varietal group in garlic cultivars. *Acta Horticulturae* 358: 157-159.
 12. Pardo, A. y C. Marín. 2003. Caracterización de cultivares de ajo en Cubiro, estado Lara. *Agronomía Tropical* 53(4): 381-395.
 13. Patena, L., A. Bariring, M. Tejano y C. Tandang. 1996. AVNET 2, collection, maintenance and propagation of garlic (*Allium sativum* L.) germplasm. *Philippines Journal of Crop Science* 21(1): 65.
 14. Peiwen, X., J. Hengying y G. Zhutai. 2001. Genetic identification of garlic cultivars and lines by using RAPD assay. *Acta Horticulturae* 555: 213-220.
 15. Pooler, M. y P. Simon. 1993. Characterization and classification of isozyme and morphological variation in a diverse collection of garlic clones. *Euphytica* 68: 121-130.
 16. Rao, K. 2004. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology* 3(2): 136-145.
 17. Rout, G., P. Das, S. Goel y N. Raina. 1998. Determination of genetic stability of micropropagated plants of ginger using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 39: 23-27.
 18. Williams, J., A. Kubelik, N. Livak, A. Rafalski, A. y S. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids. Res.* 18: 6531-6535.