PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
FACULTAD DE AGRONOMIA E INGENIERIA FORESTAL
DIRECCION DE INVESTIGACION Y POSTGRADO
MAGISTER EN FISIOLOGÍA Y PRODUCCIÓN VEGETAL

DIVERSIDAD GENÉTICA DEL AJO CHILOTE *(Allium ampeloprasum* L.) CULTIVADO EN LA ISLA DE CHILOÉ – CHILE

Tesis presentada como requisito para optar al grado de

Magister en Fisiología y Producción Vegetal

por:

Yenny Paola Medina Huaman

Comité de Tesis

Profesor Guía

Basilio Carrasco G.

Profesores Informantes

Erika Salazar S.

Marlene Gebauer H.

Marzo 2022

Santiago-Chile

Agradecimientos

Gracias al Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación La Platina, que con el financiamiento de los Proyectos 501453-70 INIA La Platina y 502891-19 INIA Remehue se llevó a cabo el presente trabajo de investigación.

Agradezco mucho el apoyo de mis asesores, a Erika Salazar por acceder a instruirme en esta área de conocimiento y ser un referente muy importante para mí en mi inicio como investigadora de la diversidad genética.

A mi profesor guía Basilio Carrasco por las enseñanzas y apoyo constante en la revisión del escrito.

A Matías Cona y Carolina Araya por la paciencia en la enseñanza de las técnicas utilizadas en la realización de este trabajo de investigación.

A Víctor Salfate, compañero y amigo a quien agradezco su constante apoyo en la parte experimental y en el análisis de datos de la presente tesis.

A mis compañeros y amigos del Banco de Germoplasma La Platina, Viviana, Rosa y Marcela.

A los amigos que hice en el transcurso de la maestría: Susan, Ivonne, Mayka y Jesús.

A David, Óscar, Judith y Jan por siempre estar para mí.

A mis abuelos: Julián y Josefina

A mis padres: Elisa y Jaime

Hermanos: Gina y Jean Pierre

Sobrino: Gianluca

INDICE

I. INTRODUCCIÓN 3
II. MATERIALES Y MÉTODOS 5
2.1 Material vegetal 5
2.2 Selección de marcadores microsatélites 7
2.3 Extracción de ADN 8
2.4 Integridad, pureza y cuantificación del ADN 9
2.5 Prueba inicial de amplificación 9
2.6 Conformación de paneles 10
2.7 PCR multiplex y simple 10
2.8 Análisis de fragmentos y lectura de alelos 11
2.9 Análisis de datos 11
2.9.1 Diversidad alélica 11
2.9.2 Número de genotipos de *A. ampeloprasum* y relaciones genéticas 12
2.9.3 Estructura de la población de *A. ampeloprasum* de la Isla de Chiloé 12
III. RESULTADOS 13
3.1 Diversidad alélica 13
3.2 Número de genotipos de *A. ampeloprasum* 14
3.3 Relación genética entre genotipos 15
3.4 Estructura de la población 18
IV. DISCUSIÓN 20
V. CONCLUSIONES 26
VI. REFERENCIAS 28
VII. ANEXOS 34

Diversidad genética del ajo chilote *(Allium ampeloprasum* L.) cultivado en la isla de Chiloé – Chile

Yenny Paola Medina Huaman

Abstract

Medina Yenny. Genetic diversity of chilote garlic (*Allium ampeloprasum* L.) cultivated on the island of Chiloé – Chile. Tesis, *Magister* en Fisiología y producción vegetal. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 38pp.

Chilote garlic (*Allium ampeloprasum* L) is an infertile, hexaploid species propagated through bulbs. In Chile, it is a traditional crop representing 5% of the national garlic production; it is cultivated mainly in the country's south. In 2019, a collection of 23 accessions was carried out in fields of small farmers in southern Chile to study this crop's genetic diversity. Microsatellite-type molecular markers were used, 11 derived from expressed sequences (ESTs-SSR) and 9 of genomic origin (nSSR). Twelve microsatellites presented amplification, allowing the existence of 41 alleles in the population to be determined, with an average of four alleles per locus. The Ho and He diversity indices were 0.57 and 0.58, respectively, the PIC was 0.47. The 266 samples were grouped into 15 multilocus genotypes. The principal coordinates analysis and the hierarchical cluster analysis used to determine the genetic relationships between the accessions showed the existence of three groups. The bayesian genetic structure analysis detected the presence of two genetic groups. The results allowed us to indicate the existence of high diversity and low genetic differentiation in the population of *A. ampeloprasum* cultivated in the Island of Chiloé. Among the 15 identified genotypes, a predominant one could be characterized morphologically and agronomically and proposed as a local variety. The diversity found in this population could be maintained by conserving 15 individuals that represent the 15 multilocus.

Key words: *Allium ampeloprasum*, great head garlic, genetic diversity, microsatellites, Chilote garlic.

I. INTRODUCCIÓN

El género *Allium* L. comprende un grupo muy diverso dentro de la familia Amaryllidaceae, con más de 800 especies distribuidas en 15 subgéneros y 56 secciones, dentro de ellas el subgénero *Allium* es el más extenso con aproximadamente 280 especies, varios son cultivos de importancia económica como la cebolla, el ajo, el puerro y diversas plantas ornamentales cuyo centro de origen y distribución se encuentra en el hemisferio norte, específicamente en los países que rodean el mar mediterráneo, islas mediterráneas, Asia central y el Norte de África (Khedim *et al*., 2020;Guenaoui *et al.,* 2013). La extensa diversidad del subgénero *Allium* ha sido muchas veces objeto de estudio para establecer las relaciones filogenéticas entre e intraespecie, pero el alto grado de polimorfismo ha dificultado en gran medida el establecimiento de estas relaciones. Tal es el caso del complejo grupo formado por *A. ampeloprasum*, que incluye variedades tanto silvestres como hortícolas, caracterizadas por presentar diferentes niveles de ploidia como el puerro (4x), kurrat (4x), cebolla perla (4x), taree (4x) y ajo de cabeza grande (6x-8x) (Hirschegger *et al.,* 2010; Khedim *et al*., 2020).

La variedad hortícola ajo de cabeza grande o ajo elefante (*A. ampeloprasum* var. *ampeloprasum* Syn*. A. ampeloprasum* var. *holmense*) de naturaleza hexaploide con centro de origen en la cuenca del mediterráneo se ha expandido como cultivo a otros países de América como EE.UU., Argentina y Chile. En este último, es conocido como “ajo chilote” o “ajo blandino”, sin embargo, no es estrictamente un ajo porque no pertenece a la especie *Allium sativum* L, se caracteriza por presentar bulbos grandes de 8 a 10 cm de diámetro que llegan a pesar en promedio 600 g y por su menor sabor y olor a ajo (Ravinowitch y Currah, 2002; Fristch y Friesen, 2002; Daza, 2005; Pertierra *et al*., 2020). En razón a estas características es cultivado y comercializado como producto fresco o procesado en forma de pastas teniendo como destino el mercado interno y externo. En Europa y EE. UU es consumido como un producto gourmet altamente cotizado (Besoain *et al*.,2002; Daza, 2005). Además de sus características culinarias, también es apreciado por sus propiedades medicinales, un ejemplo es su efecto anticancerígeno, al inhibir el crecimiento de células de osteosarcoma evitando la transición del estado G1 a S del ciclo celular de la célula cancerígena. Por otro lado, se ha reportado que su actividad antibacteriana en cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus,* es mayor que el de la ampicilina (Huang y Ren, 2013). En la

búsqueda de alimentos nutraceúticos, la variedad ajo de cabeza grande se convierte en una alternativa de cultivo importante que además de aportar energía, contribuye con la prevención de enfermedades (Dey y Khaled, 2013).

A nivel nacional su producción representa el 5% de la producción total de ajo y está concentrada en la región de Los Lagos, específicamente en la isla de Chiloé donde es considerado un cultivo ancestral, siendo el segundo cultivo de mayor importancia en la isla después de la papa (Pertierra *et al*., 2020). Recientemente, por la alta demanda, también es cultivado en algunas zonas de la región de Valparaíso y Magallanes (ODEPA, 2015; ODEPA, 2018). Estos cultivos se producen bajo sistemas de huertos caseros donde se obtienen rendimientos entre 6 -12 t ha^{-1} que se deben en gran parte al escaso manejo de algunos aspectos agronómicos como el riego, control de malezas, la mecanización de cosecha y al uso de semillas de baja calidad sanitaria (Catalán, 2011).

El ajo chilote, al igual que otras especies de *Allium*, carece de fertilidad, por lo que su propagación se realiza a través de bulbillos o dientes; esto sumado a las prácticas de cultivo donde se ha seleccionado a favor de la uniformidad ha llevado a una pérdida importante de diversidad de este cultivo a nivel local. El resguardo de la biodiversidad es necesario para contar con material genético del cual se puedan seleccionar clones adaptados a un particular ambiente, o bien para servir como potencial genético para mejorar la productividad, adaptación y resistencia a estreses abióticos y bióticos que se espera en el contexto del cambio climático y el calentamiento global para los cultivos (Egea *et al*, 2017). Para hacer eficiente el uso de este recurso genético es necesario evaluarlo y caracterizarlo en función de características morfológicas o fenológicas; sin embargo, estos rasgos suelen ser influenciados por el ambiente y las condiciones fitosanitarias del cultivo. Ante esta limitación la caracterización molecular, mediante el uso de marcadores moleculares, puede entregar información valiosa de la cantidad y distribución de la diversidad genética.

En trabajos relacionados a caracterización molecular en Chile se ha reportado el uso de marcadores moleculares del tipo RAPDs (ADN Polimórfico Amplificado al Azar) para caracterizar clones de *A. sativum,* pero ellos no permitieron identificar diferencias importantes entre las accesiones (Paredes *et al*., 2007). Aránguiz (2019) evaluó 7 microsatélites en 137 accesiones de *A. sativum* logrando determinar una mayor proporción de genotipos que accesiones indicando que hay diversidad dentro de las

poblaciones evaluadas. Sin embargo, en la especie *Allium ampeloprasum* los trabajos relacionados con caracterización fenotípica y más aún molecular no han sido reportados y a nivel mundial, los estudios de diversidad de este cultivo son escasos (Guenaoui *et al.,* 2013; Hirschegger *et al.,* 2010).

El ajo chilote es una especie altamente heterocigota, cuya domesticación se ha llevado a cabo por selección del tamaño de los bulbos de plantas silvestres que se adaptaron a condiciones de cultivo (Guenaoui *et al*., 2013). Esta diversidad sería mantenida dado la propagación vegetativa del cultivo. Para conocer la diversidad de ajo chilote cultivado en la Isla de Chiloé, y en razón a la importancia económica como cultivo hortícola que representa el ajo chilote para los agricultores que lo cultivan, la presente investigación tiene por objetivo caracterizar molecularmente accesiones de ajo chilote a través de marcadores moleculares de tipo Simple Sequence Repeat (SSR), los cuales presentan ventajas sobre otros marcadores como ser altamente polimórficos e informativos, codominantes y reproducibles (Carneiro *et al*., 2016).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Está representado por 23 accesiones de *A. ampeloprasum*, 19 recolectadas en 2019 y 2020 en diferentes localidades dentro de la isla de Chiloé en la región de Los lagos, 2 de San Carlos en la región de Ñuble, 1 de la Región Metropolitana y una accesión sin origen definido (Figura 1). Cada accesión es un conjunto de individuos o muestras recolectados en un sitio, con un rango de 1 a 23 muestras por accesión, estando la población de ajo chilote formado por un total de 266 muestras.

La regeneración del material vegetal se realizó a partir de bulbillos que fueron plantados en terreno previamente preparado y fertilizado con fosfato diamónico, sulfato de potasio y nitrato de potasio en dosis de 400, 200 y 100 $kg \cdot ha^{-1}$ respectivamente, los bulbos fueron desinfectados con una solución de fungicida Stroby SC (20 mL por 100 L de agua) y nematicida Furadan 350 L (20 mL por 100 L de agua) antes de ser plantados. El riego se efectuó una vez por semana y la remoción de maleza se realizó manualmente.

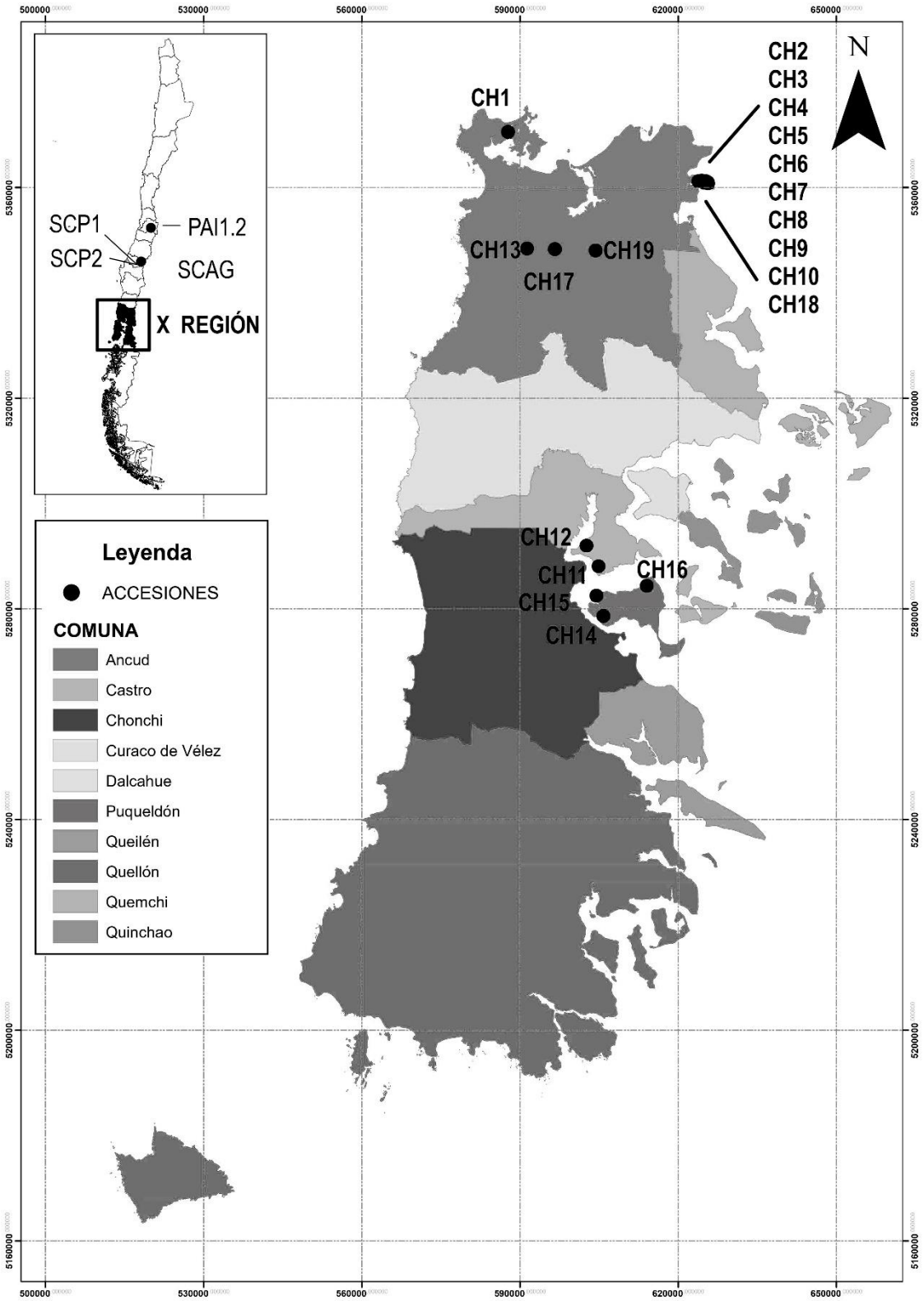

Figura 1. Ubicación geográfica del origen de las accesiones de *Allium ampeloprasum* L

2.2 Selección de marcadores microsatélites

Se seleccionaron 20 marcadores moleculares del tipo microsatélite (SSR) desarrollados para *Allium cepa* L. y *A. sativum,* de los cuales 9 corresponden a marcadores derivados secuencias expresadas (ESTs-SSR) y 11 de origen genómico (nSSR). La elección de los marcadores se realizó en función a su origen, transferibilidad, contenido de información polimórfica (PIC) y al número de alelos. Los partidores sentido y antisentido de los marcadores se sintetizaron y se marcaron fluorescentemente (Tabla 1).

Tabla 1. Listado de marcadores SSR evaluados

Marcador	Motivo	Secuencia Forward	Secuencia Reverse	Origen	Fuente
ACM086	(TAG)5	GCGGATTGGATCATCAGATT	TTCTTGATTCCTCCGTTTGG	*A. cepa*	Kuhl *et al*. (2004)
ACM107	(ACC)5	CCTTCATTCCCAAAGCACAT	GCGATAAAGAGGGACAGCAG		
ACM042	(ATA)5	TCATCAACACCAACAACAACA	TCTGTGAACCTCCTCAAGCA		
AsESSR-014	(AAG)8	CCCCTTCGGTTGTTTTTCTT	CTGGGTACGGTCGTTATTGG	*A. sativum*	Barboza *et al*. (2018).
AsESSR-077	(TAAAA)3	CAAGGAGCGACACATAAAAGAA	GGGAGAATTCAAACTGTACGAAG		
ACM300	(GCA)7	AGGTGCAGTTTCGTGGTAGG	TTAGCCCCTGGTAAGTGTGG	*A. cepa*	Mallor *et al*. (2014).
ACM012	(AAG)6	GGAGAAAAAGCCCGAAGAAG	ATTCCCATAGCCTTGCTTGA	*A. cepa*	Kuhl *et al*. (2004)
AsESSR-078	(CTTTT)3	TCTGACAGACGACCTGGAGAT	ATCACTGCCTCTCCACAAGAA	*A. sativum*	Barboza *et al*., (2018).
ACM029	(CAG)6	CCCACATCAACTCCATACCC	CCAATGCCTCTGTCTAACTCC	*A. cepa*	Kuhl *et al*. (2004)
GB-AS-046	(GTG)3	GGGTGCACGAAACTACCA	TCGTTAAATCGAACCTAACCC	*A. sativum*	Lee *et al*. (2011)
GB-AS-028	(TA)5	AGCGAAAGGTGGTTCCAT	AGACCACGCTGCATAACG		
GB-AS-078	(GT)12	TGTTCCAACCAGATTTAATGC	AAGTGGCGGTTGTGTCTG		
GB-AS-112	(TA)5	GTTGCAGGTCCAGGTTCA	ACCAGCAACAACACAG GG		
GB-AS-089	(AG)4(TAG)3	GTCCAAGGAGGCAAGGAC	GGCTAGCCAATCCATTCC		
GB-ASM-053	(CA)15, (AC)8	ACAAGGTCGACATCGTTTG	GGGCTTCACCTGAACACA		
GB-AS-088	(GT)8	GAACTCGAACATGCGCTC	CACACATACCCACACCCC		
GB-AS-043	(GGC)3	GAGCGCAGAAATTTCCCT	ATCCACACCAAGGAGGCT		
Asa24	(GT) 4 (GT) 3 (GT) 5	TTGTTGTGCCGAGTTCCATA	CAGCAATTTACCAAAGCCAAG	*A.*	Cunha *et al*.

Asa08	(GT) 8	TGATTGAAACGAATCCCACA	GGGGGTTACCTGAACCTGTTA	*cepa*	(2012)
Asa18	(TG)8	TCAAGCTCCTCCAAGTGTCC	TCGGGATATGACAGCATTTG		

2.3 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo de Barra *et al*. (2012), se colectó aproximadamente 50-100 mg de tejido proveniente de hoja o meristemo de bulbillo, en el caso de hoja se congeló con nitrógeno líquido; las muestras se pulverizaron mecánicamente con pistilos en microtubos de centrifuga de 1,5 mL y se agregó 650 µL del buffer de extracción. Para 100 mL de buffer de extracción se preparó un mix de 10 mL de 100 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 40mL de 2 M NaCl, 4 mL de 20 mM EDTA (pH 8,0) y 2% p/v CTAB. Antes de usar se añadió 1% p/v de polivinilpirrolidona (PVP) y carbón activado al 0,5% p/v.

La mezcla se incubó a 55 °C por 20 min, y centrifugó a 12000 rpm por 5 min a 4 °C. El sobrenadante se incorporó sobre un nuevo tubo conteniendo 1µL de RNAsa a 20 mg mL^{-1} y se incubó a 37 °C por 60 min. Luego se añadió cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) en un volumen 1:1 y se mezcló por inversión por 5 min, se centrifugó a 12000 rpm por 5 min para visualizar dos fases; en un nuevo tubo se retiró la fase acuosa y se añadió 1 volumen de isopropanol frio, se mezcló por inversión hasta generar la precipitación del ADN y se refrigeró a -20 °C por 1 h. Luego, se centrifugó a 12000 rpm a 4 °C por 5 min, se eliminó el sobrenadante y se invirtieron los tubos sobre papel toalla para eliminar el remanente, se añadió 300 µL de etanol al 75%, luego se suspendió el ADN en disolución y centrifugó a 12000 rpm por 1 min, se eliminó el alcohol y se evaporó el alcohol restante en baño seco termorregulado, finalmente se añadió 100 µL de agua ultra pura para resuspender el ADN y se solubilizó incubando a 37 °C por 1 h. Las soluciones de ADN fueron almacenadas a -20 °C hasta su posterior uso.

2.4 Integridad, pureza y cuantificación del ADN

La integridad del ADN extraído fue comprobada por medio de electroforesis en gel de agarosa 1% p/v, a condición de 100 volt durante 20 min. La muestra de carga por pocillo estuvo conformada por 2 µL de ADN mezclado con 2 µL de buffer de carga con GelRed. Se utilizó 4 µL del marcador de peso molecular *λ/Hin*dIII como referencia. Finalmente, el gel se visualizó en un trans-iluminador UV (100-400nm) y se fotodocumentó.

La determinación de la pureza y cuantificación del ADN se realizó mediante espectrofotometría (Nanodrop ACT Gene ASP-2680), para realizar la medición se utilizó 2 µL de ADN sin diluir. El grado de pureza del ADN se determinó utilizando la relación de absorbancia a 260: 280 nm, considerándose como pureza óptima el rango de 1,8-2. Para la cuantificación se utilizó la absorbancia a 260 nm, y en función a la concentración de ADN obtenido se procedió a realizar diluciones a una concentración de 10 ng μL^{-1}

2.5 Prueba inicial de amplificación

Se realizó una prueba preliminar de amplificación individual de los marcadores utilizando un set de 8 muestras, se preparó una mezcla final de 10 µL conteniendo 5 µL de mastermix 2X (Platinum Multiplex, Applied Biosystems), 0,1 µL de partidor forward 10 µM, 0,1 µL de partidor reverse 10 µM, 2 µL de ADN 10 ng μL^{-1} y 2,8 mL de agua ultrapura. La temperatura de annealing se determinó en función de la temperatura de melting, siendo de 58° C para los nSSR y de 53° C para los ESTs-SSR. Las condiciones de amplificación consistieron en una etapa inicial de denaturación a 95° C por 2 min, seguido de 35 ciclos a 95° C por 30 s, 1,3 min a temperatura de annealing específica para los partidores (Tabla 2) y 72° C por 30 s, y un paso de extensión final a 72 °C por 30 min. Las reacciones se realizaron en dos termocicladores (Veriti Applied biosystems (Thermofisher Scientific y XP Cycler Bioer Technology).

Los productos de amplificación se visualizaron a través de electroforesis en gel de agarosa 2% p/v, a condición de 100 volt por 30 min, la muestra de carga estuvo conformado por 2 µL del producto de amplificación y 2 µL de Buffer de carga con GelRed, se utilizó como marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific. Finalmente, los geles se visualizaron en un trans-iluminador UV (100-400nm) y se fotodocumentaron se consideró amplificaciones positivas cuando las muestras presentaban amplicones dentro del rango de longitud reportada.

2.6 Conformación de paneles

Los marcadores que mostraron amplificación positiva fueron asignados en paneles de acuerdo al tamaño de alelo reportado, fluoróforo marcado y temperatura de annealing.

Los marcadores GB-AS-028 y GB- AS-04 se amplificaron individualmente para conformar un poolplex.

Tabla 2. Asignación de marcadores en paneles

Marcador	Motivo	Tamaño de amplicón	Fluoró-foro	T annealing (° C)	Concentración	Panel
ACM086	(TAG)5	158-180	FAM	53	100 nM	2Aa
ACM107	(ACC)5	213	PET	53	80 nM	2Aa
AsESSR-014	(AAG)8	296	FAM	53	100 nM	2Aa
ACM300	(GCA)7	170-181	FAM	53	120 nM	3Aa
ACM012	(AAG)6	222	PET	53	70 nM	3Aa
AsESSR-078	(CTTTT)3	278	VIC	53	160 nM	3Aa
ACM029	(CAG)6	297	FAM	53	130 nM	3Aa
GB-AS-112	(TA)5	239	NED	58	150 nM	4Aa
GB-AS-089	(AG)4(TAG)3	389	FAM	58	50 nM	4Aa
GB-ASM-053	(CA)15, (AC)8	191	PET	58	150 nM	4Aa
GB-AS-046	(GTG)3	166	FAM	58	182 nM	Poolplex 1Aa
GB-AS-028	(TA)5	230	NED	58	30 nM	Poolplex 1Aa

2.7 PCR multiplex y simple

Las reacciones de amplificación multiplex se realizaron con un volumen final de 10 µl conformado por 5 mL de mastermix 2x, 2 µl de mix de partidores 5x y 3 µl de ADN 10 ng μl^{-1}; el mix de partidores estuvo compuesto por los partidores en sentido y antisentido en concentración establecida para cada panel (Tabla 2).

Los marcadores del panel 1Aa (GB-AS-046 y GB-AS-028) se amplificaron de forma individual en un volumen final de 10 µL conteniendo 5 µL de platinum mastermix 2X, concentración específica para cada partidor sentido y partidor antisentido (Tabla 2), 2 µL de ADN 10 ng μL^{-1} y completada con agua ultrapura.

Antes de resolver los alelos SSR, se confirmó la amplificación de los marcadores mediante electroforesis en gel de agarosa en las mismas condiciones utilizadas en la prueba de amplificación inicial.

2.8 Análisis de fragmentos y lectura de alelos

Los amplicones resultantes fueron analizados mediante un equipo de electroforesis capilar (Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer), para determinar el tamaño de los alelos se utilizó un estándar de tamaño interno GeneScan 500LIZ. La muestra de análisis estuvo conformada por un volumen final de 12 µL conteniendo 2 µL del producto PCR y 10 µL de solución de formamida Hi di y el estándar de tamaño interno, luego se denaturó a 94 °C por 4 min e inmediatamente fue colocada en frío.

La lectura de los resultados de la electroforesis capilar se realizó en forma manual con el programa GeneMapper® v.4.0 (Applied Biosystems), se generó una matriz de datos con los tamaños de alelos para cada marcador. El binning de los datos se realizó de forma manual, para ello se tuvo en consideración el motivo de cada marcador (Anexo 2). Finalmente, con la matriz generada se realizó los análisis genéticos posteriores.

2.9 Análisis de datos

2.9.1 Diversidad alélica

Preliminarmente mediante el software Genodive vs 3.05 (Meirmans, 2021) se realizó la estimación de frecuencias alélicas para organismos poliploides con ambigüedad de dosis alélica utilizando la función “corrección de dosis alélica en poliploides”, esta función usa un algoritmo de máxima verosimilitud propuesto por De Silva *et al*., (2005) para el cálculo de las frecuencias. A partir de las frecuencias alélicas estimadas se determinó el número de alelos (Na), la heterocigosidad observada (Ho) y la heterocigosidad esperada (He). El contenido de información polimórfica (PIC) se calculó a través del paquete Polysat 1.7 de R (Clark *et al*.,2017).

2.9.2 Número de genotipos de *A. ampeloprasum* y relaciones genéticas

La determinación del número de genotipos se realizó manualmente combinando la información genotípica de los loci para generar los genotipos multilocus (MLG), este es un primer paso en la caracterización de la diversidad genética de organismos que se reproducen clonalmente (Pantoja *et al.*,2017; Bailleul *et al.*,2016). Adicionalmente, los genotipos multilocus generados se comprobaron mediante la función asignamiento de clones del programa Genodive vs 3.05 (Meirmans, 2021). A partir de los genotipos multilocus se determinaron las distancias genéticas mediante el paquete Polysat 1.7 de R (Clark *et al.*,2017). La distancia utilizada corresponde a la de Bruvo *et al.*, (2004), el cual a diferencia de las distancias basadas en presencia y ausencia de alelos, incorpora en su cálculo el modelo mutacional paso a paso para microsatélites, sosteniendo que la variación de la longitud entre los alelos de un locus es el resultado del emparejamiento incorrecto de la hebra deslizada Dentro de los algoritmos propuestos por Polysat se utilizó “meandistance.matrix2” debido a que modela el número de copia del alelo para genotipos ambiguos. Para ello utiliza datos como la ploidia, tasa de autofecundación que en este estudio fue fijado como 0 y las frecuencias alélicas en toda la población.

Para la determinación de la relación genética entre los genotipos multilocus se realizó un análisis jerárquico de clúster utilizando el programa NCSS (NCSS,2020), el método de agrupamiento elegido corresponde al modelo promedio de grupo no ponderados o UPGMA (por sus siglas en ingles), en el cual la distancia entre dos grupos se calcula como el promedio de las distancias entre cada uno de sus miembros ,este método fue elegido por su robustez y su menor susceptibilidad al ruido y valores atípicos. Así mismo, se generó un análisis de coordenadas principales con GenAlEx v6.503 (Peakall y Smouse, 2006) un complemento del programa Excel. Para ambos análisis multivariados se usó la matriz de distancia de Bruvo generada.

2.9.3 Estructura de la población de *A. ampeloprasum* de la Isla de Chiloé.

El software Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.,* 2000) se utilizó para inferir la estructura genética de los genotipos multilocus a través de una aproximación bayesiana, utilizando un período de quemada (burn-in) de 10.000, un largo de corrida de 100.000, asumiendo un modelo sin existencia de mezclas y una correlación de la frecuencia de alelos. Se estableció un número de k poblaciones de 1 a 15 para lo cual se realizaron 5 corridas independientes por cada k. Se escogió el número de k más probable siguiendo el método

descrito por Evanno *et al.* (2005) el cual indica que aquel que posea el mayor valor de Δk es el número más probable de poblaciones presentes el cual fue calculado utilizando el programa Structure Harvester v.0.6.94 (Earl y Von Hold, 2012).

III. RESULTADOS

3.1 Diversidad alélica

De los 20 marcadores inicialmente seleccionados solo 12 mostraron amplificación positiva, 7 de ellos corresponden a ESTs-SSR y 5 a nSSR; el número de alelos encontrados en la población de *A. ampeloprasum* fue de 41, con un promedio de 3,42 y un rango de 1-6 alelos por locus, la Ho en promedio fue de 0,578 y la Hs de 0,587. El contenido de información polimórfica (PIC) de los marcadores fue de 0,47 en promedio, con un rango entre 0-0,769. El PIC mostró que el marcador As ESSR-078 fue el más informativo con 0,769, seguido del marcador ACM300 y GB-ASM-053 ambos con 0,768. El marcador menos informativo corresponde a ACM 107 que fue monomórfico en todas las muestras (Tabla 3).

Tabla 3. Índices de diversidad

MARCADOR	TIPO	LOCUS	NA	NEA	Ho	Hs	PIC
ACM086	EST-SSR	loc1	4,000	3,934	0,826	0,793	0,703
AsESSR-014	EST-SSR	loc2	5,000	2,999	0,693	0,729	0,594
ACM107	EST-SSR	loc3	1	1	0	0	0
ACM300	EST-SSR	loc4	5,000	4,983	0,931	0,835	0,768
ACM012	EST-SSR	loc5	3,000	2,969	0,706	0,724	0,593
ACM029	EST-SSR	loc6	3,000	2,023	0,478	0,585	0,381
AsESSR-078	EST-SSR	loc7	6,000	4,899	0,923	0,833	0,769
GB-AS-089	nSSR	loc8	2,000	1,946	0,478	0,56	0,375
GB-AS-112	nSSR	loc9	3,000	1,978	0,489	0,574	0,378
GB-ASM-053	nSSR	loc10	5,000	4,780	0,911	0,831	0,768
GB-AS-028	nSSR	loc11	2,000	1,009	0,011	0,009	0,023
GB-AS-046	nSSR	loc12	2,000	1,981	0,485	0,575	0,375
Promedio			3,42		0,578	0,587	0,47

3.2 Número de genotipos de *A. ampeloprasum*

Se determinaron 15 genotipos multilocus (MLG) presentes en la población de ajo chilote representadas por 23 accesiones (19 accesiones de la Isla de Chiloé en la región de Los lagos,2 de San Carlos en la región de Ñuble, 1 de la Región Metropolitana y una accesión sin origen definido). Once de estas 23 accesiones resultaron ser totalmente clonales y corresponden a las accesiones CH2, CH5, CH8, CH13, CH14, CH15, CH16, CH17, CH18, CH19 y SCAG4. La accesión CH1 presenta 14 muestras clonales y 6 muestras con polimorfismo, CH4 presenta 17 muestras clonales y 1 muestra polimorfica,CH6 presenta 12 muestras clonales y 1 muestra polimórfico,CH7 presenta 15 muestras clonales y 5 muestras polimórficas, CH9 presenta 17 muestras clonales y 3 muestras polimórficas, CH10 presenta 17 muestras clonales y 3 polimórficas, CH11 presenta 19 muestras clonales y 4 polimorficas,CH12 presenta 19 muestras clonales y 1 polimórfica, SCP1, SCP2 y PAI1.2 presenta 1 muestra clonal cada uno (Anexo 1).

Dentro de los 15 MLG encontrados, el MLG 1 está representado por 236 de 266 muestras, e incluyen individuos de las 11 poblaciones clonales anteriormente mencionados. El MLG 6 está conformado por las muestras CH1.14, CH 3.9, CH7.14, CH7.17 y PAI 1.2 (5 muestras); el MLG 7 compuesto por las muestras CH10.19, CH10.20, CH11.11 y CH11.12 (4 muestras); el MLG 12 conformado por individuos de CH 1.11, CH1.12, CH3.15 y CH12.9 (4 muestras); el MLG4 conformado por muestras de CH 11.13, CH11.14 y SCP2 (3 muestras): el MLG 8 conformado por individuos de CH1.15, CH7.13 y CH7.16 (3 muestras); el MLG 2 conformado por individuos de CH4.4 y CH 6.12 (2 muestras); el MLG 9 conformado por muestras de CH9.2 y CH9.4 (2 muestras) y los MLG 3, 5 ,10 ,11,13,14 y 15 están conformados cada uno por una sola muestra que corresponden a CH1.8, CH7.3, CH9.19, CH10.18, CH3.16, CH1.13 y SCP1 respectivamente (Figura2).

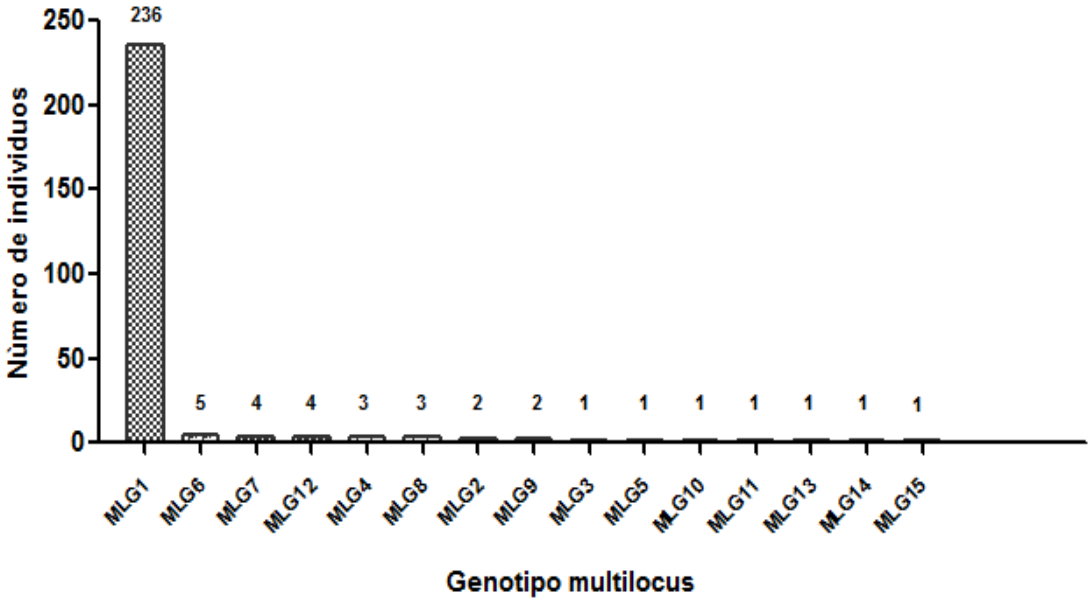

Figura 2. Distribución de frecuencias de los 15 genotipos multilocus en la población de *A. ampeloprasum* analizada.

3.3 Relación genética entre genotipos

La relación genética entre los 15 MLG fue analizado mediante el método de cluster de promedios no ponderados utilizando la matriz de distancia genética de Bruvo. El dendrograma generó 3 clústers (Figura 3). El cluster I está conformado por el MLG15 y está representado por la accesión SCP1 (1 muestra), además, constituye el cluster más diferenciado con 0,4 de distancia genética, el cluster II agrupa a los MLG 12,13 y 14 y el cluster III agrupa a los 11 restantes multilocus (MLG 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11). Los cluster generados no muestran correlación con el origen de las accesiones.

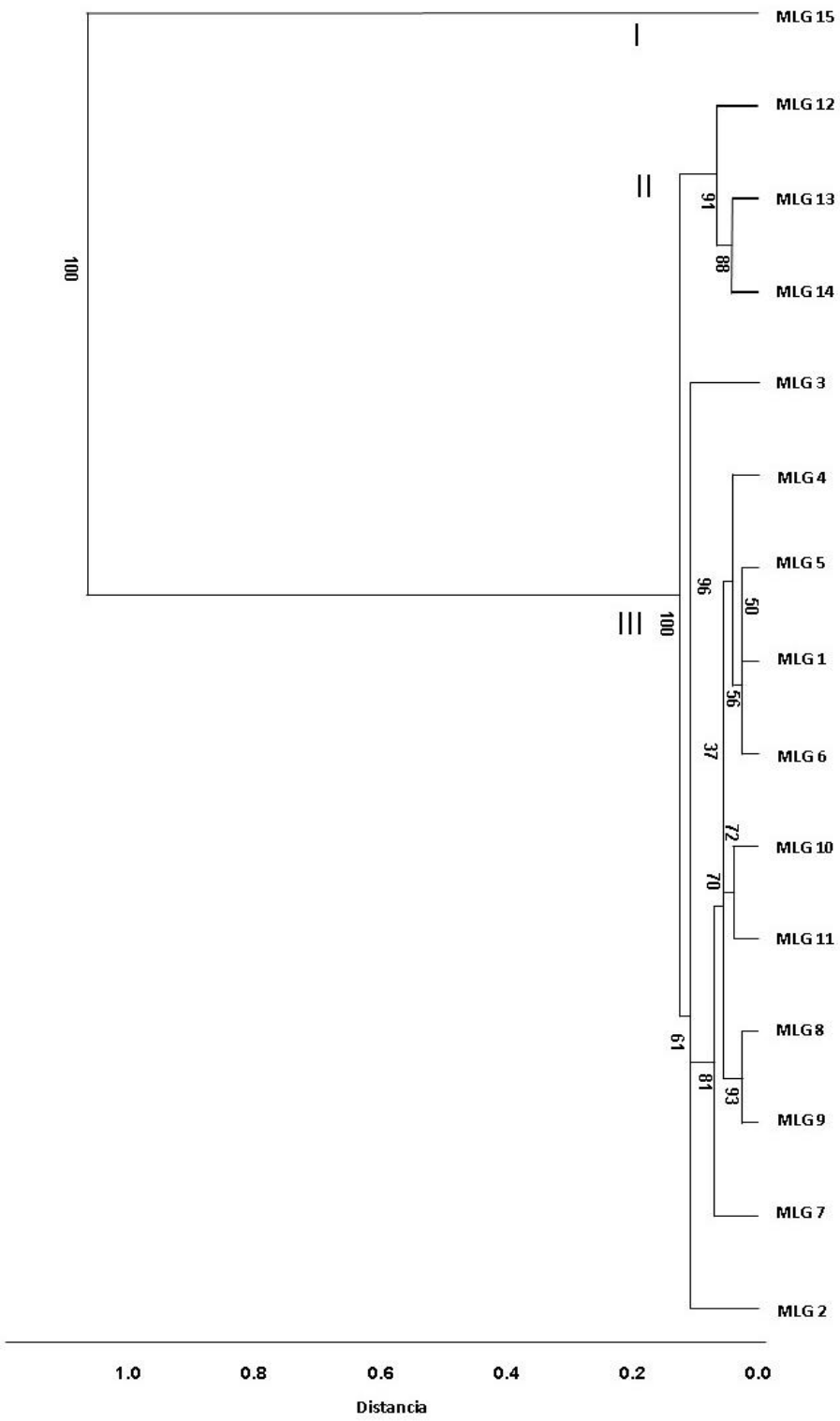

Figura 3. Dendrograma mostrando las relaciones genéticas entre los 15 genotipos multilocus.

En el análisis de coordenadas principales (PCoA) utilizando la matriz de distancia de Bruvo de los 15 multilocus, las dos primeras coordenadas principales explican el 71,51% de la variabilidad molecular observada (Figura 4). La coordenada I explica el 54,09% de la variabilidad entre los genotipos multilocus y permite diferenciar claramente 2 grupos, el primero formado por el MLG 15 y el segundo formado por los 14 MLG restantes; por otro lado, la coordenada II explica el 17.42% de la variación y genera dos grupos, el primer grupo conformado por el MLG 12,13 y 14 y el segundo por los 12 multilocus restantes (MLG 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11). Los grupos formados en el PCoA concuerdan con los generados en el dendrograma.

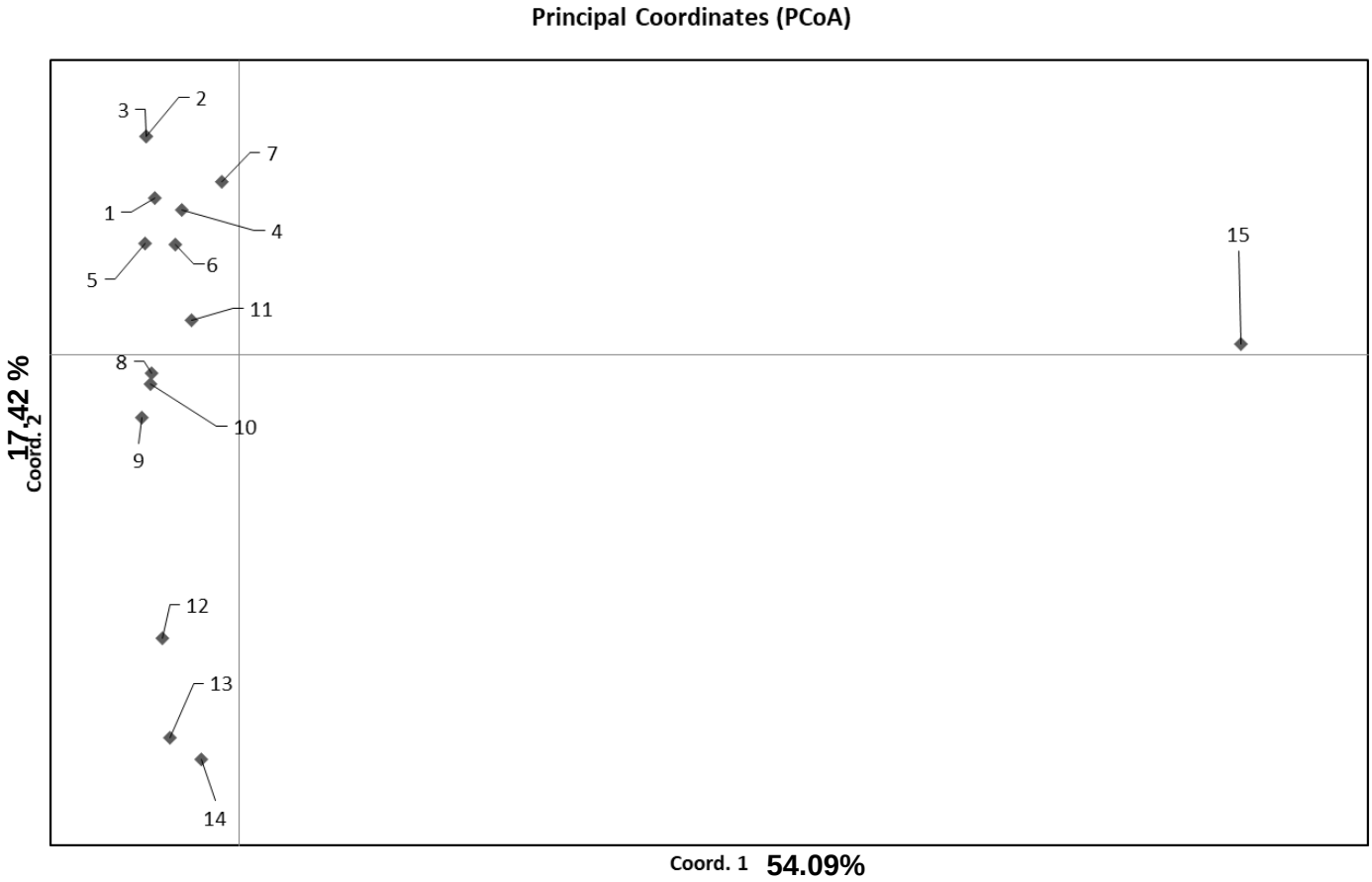

Figura 4. Análisis de coordenadas principales (PCoA) mostrando las relaciones genéticas entre los 15 genotipos multilocus.

3.4 Estructura de la población

El análisis bayesiano indicó que los 15 MLG generados a partir de las 266 muestras contenidas en 23 accesiones se agruparon en dos cluster genéticos (Figura 6) siendo el K=2 el más probable el cual presenta un ΔK de mayor valor (Figura 5). El cluster I formado por el MLG 15 está graficado con el color gris oscuro y el cluster II conformado por los 14 MLG restantes (MLG 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13 y 14) está representado por el color gris claro. Estos dos cluster también se observan en el análisis agrupación jerárquica y en el PCoA.

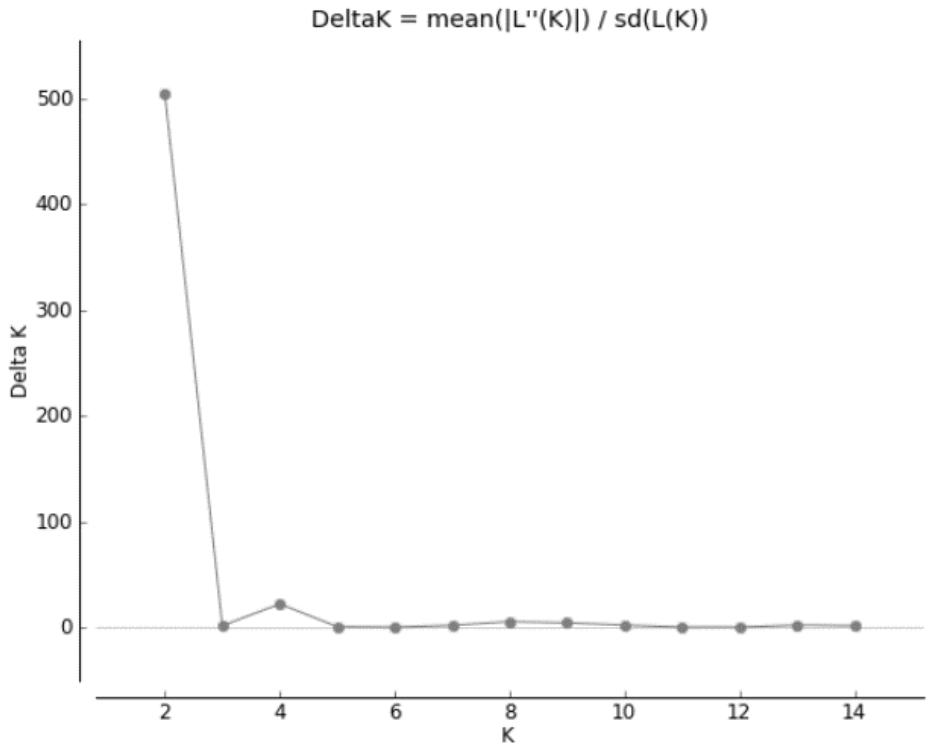

Figura 5. Valores de ΔK para cada número de grupos (K) para 15 MLG de A*llium ampeloprasum* L.

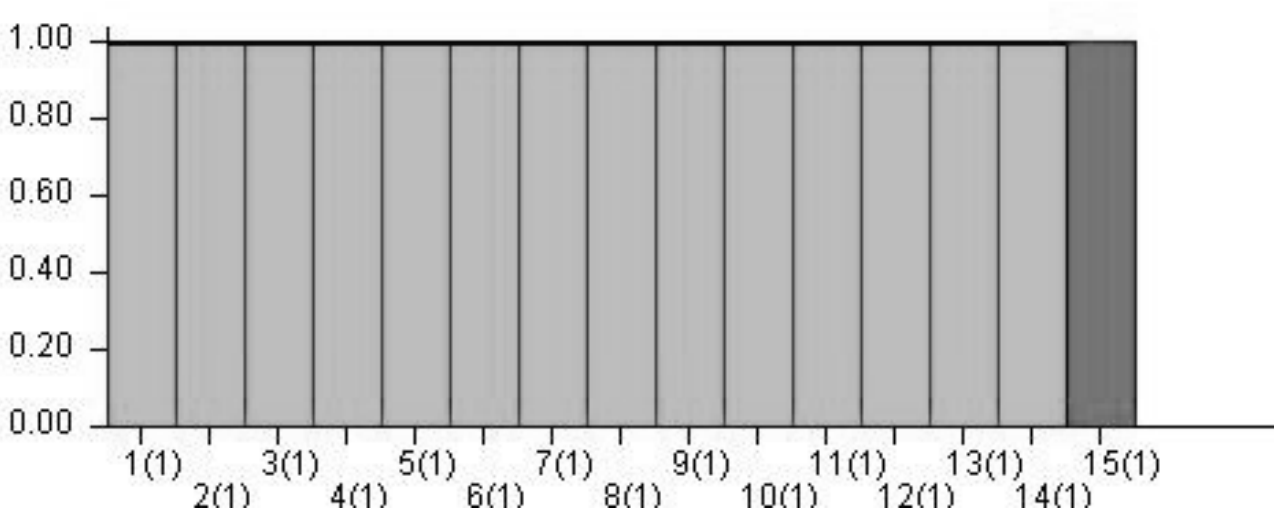

Figura 6. Clasificación de 15 multilocus de *Allium ampeloprasum* L. en dos grupos principales utilizando el software STRUCTURE 2.3.4

IV. DISCUSIÓN

Los estudios genéticos moleculares entre los miembros del género *Allium* han sido constantemente investigados, con énfasis en las relaciones filogenéticas de sus especies (Qin-Qin *et al.,*2010; Friesen *et al*., 2006). Sin embargo, la variación a nivel intrapoblacional en una misma especie ha sido poco evaluado. En el presente trabajo se realizó el estudio genético de la población de ajo chilote (*Allium ampeloprasum var. ampeloprasum)* cultivado principalmente en la Isla de Chiloé de Chile donde representa un cultivo local y ancestral que es valorado por su importancia económica, farmacológica y culinaria.

El estudio genético se realizó utilizando 20 marcadores moleculares tipo microsatélite desarrollados en otras especies de *Allium.* Nueve pertenecen a microsatélites derivados de secuencias expresadas y 11 son de origen genómico, de los cuales un 66,6% (7 ESTs-SSR) y 45,5 % (5 nSSR) amplificaron positivamente en *A. ampeloprasum.* Algunos de los microsatélites que no mostraron amplificación fueron GB-AS-078, GB-AS-088 y GB-AS-043 aislados de *Allium sativum.* En Lee *et al*. (2011), estos mismos marcadores presentaron amplificación positiva en un set de 5 especies de *Allium* incluyendo *A. ampeloprasum* var*. porrum* con 70.6%, 94,1% y 70,6% de transferibilidad cada uno. Los marcadores genómicos de origen en *Allium cepa* Asa 24 y Asa 18 tampoco amplificaron en el set de muestras analizadas en este estudio. De igual forma los microsatélites derivados de secuencias expresadas ACM 042 y AsESSR-077 en Barboza *et al*. (2018), amplificaron positivamente en *A. ampeloprasum* var. *porrum* y *A. ampeloprasum* var. *ampeloprasum*. La razón de la carencia de amplificación puede deberse a desajustes en los cebadores, al diseño de cebadores en sitios de empalme o a la presencia de grandes intrones dentro del amplicón objetivo (Varshney *et al*., 2006; Cloutier *et al.,* 2009).

En relación a la procedencia de los SSR, un 50% y 83,33% de los marcadores con origen en *A. sativum* y *A. cepa* respectivamente, mostraron amplificación positiva en las muestras *de A. ampeloprasum*, contrastando con Barboza *et al*. (2018), al mencionar que existe una mayor transferibilidad de ESTs- SSR en parientes cercanos a la especie donante dado que *A. ampeloprasum* var. *ampeloprasum* es más cercano a *A. sativum* que a miembros de la sección Cepa (Guenaoui *et al*.,2013; Terzaroli *et al.*, 2021). No obstante, esta alta transferibilidad podría deberse a que los microsatélites derivados de cebolla provienen de secuencias expresadas (EST-SSR), los cuales presentan altas

tasas de transferibilidad en comparación con los genómicos (nSRR) debido a que las secuencias transcritas en los ARN presentan un mayor grado de conservación entre especies relacionadas (Wang *et al.,* 2020).

El análisis de los 12 marcadores en las 23 accesiones de ajo chilote detectó 41 alelos en toda la población con un promedio de 3,42 alelos por locus y un rango de 1 a 6 alelos. Terzaroli *et al.* (2021) utilizando marcadores de tipo polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) caracterizó una colección formada por muestras de *A. ampeloprasum* pertenecientes al grupo *porrum*, al grupo *ampeloprasum*, y al grupo *holmense* que en Italia es conocida como "Aglione", encontrando 482 amplicones polimórficos. En Barboza *et al*. (2018) utilizando 14 ESTs- SSR (12 de origen en *A. sativum* y 2 de origen en *A. cepa*) en una colección de 21 accesiones de *A. sativum* reportó 36 alelos en la población con un promedio de 2,6 alelos por locus y un rango de 2 a 4 alelos por locus. Kumar *et al*. (2019) con 10 nSSR en una colección de 53 accesiones de *A. sativum* de origen hindú reportó 39 alelos con un promedio de 3,9 alelos por locus y un rango de 2 a 8 por locus. Ipek *et al*. (2015) en 31 accesiones de *A sativum* utilizando 26 ESTs- SSR de origen en *A. sativum* detectó 130 alelos con un promedio de 5 alelos y un rango de 2 a 13 alelos por locus. Los resultados encontrados muestran que existe una similitud en el número de alelos encontrados en los estudios de Barboza y Kumar. Sin embargo, es menor a la reportada por Ipek y Terzaroli lo cual puede deberse al tipo de marcador utilizado (AFLP o SSR), a la cantidad de marcadores utilizados, al número de muestras y al origen del material (Sanchez,2017).

El índice diversidad PIC, el que mide el poder discriminatorio de un sistema de marcadores, fue en promedio de 0,47 siendo los marcadores AsESSR-078, ACM 300 y GB-ASM -053 los más informativos con 0,769. El primero de estos marcadores en Barboza *et al*. (2018) registró un PIC de 0,33 en un set de 21 accesiones de *A. sativum*. El marcador GB- ASM -053 en Lee *et al*. (2011) no se registró el PIC, sin embargo, detectó la presencia de 2 alelos en *A. ampeloprasum* var. *porrum* a diferencia de los 5 alelos por locus que se registraron en las muestras de ajo chilote analizadas. El marcador ACM300 en Mallor *et al*. (2014) registró 5 alelos en *A. ampeloprasum*, la misma cantidad de alelos ha sido encontrada en la población evaluada en el presente trabajo. En contraste, el marcador menos informativo fue ACM 107 siendo monomórfico en todas las muestras, al respecto no se ha reportado el PIC ni número de alelos detectado por

este marcador en otros trabajos, pero sí su amplificación positiva ha sido obtenida en Barboza *et al*. (2018) en muestras de *A. ampeloprasum* var. *porrum* y *A. ampeloprasum* var. *ampeloprasum* lo que coincide con los resultados obtenidos. Los resultados muestran que los marcadores AsESSR-078, ACM300 y GB-ASM-053 tiene un elevado poder discriminatorio y por lo tanto, pueden ser útiles para diferenciar genotipos de *A. ampeloprasum* var. *ampeloprasum*. Por otro lado, la variación en el PIC obtenido en los diferentes trabajos puede ser una consecuencia de analizar muestras provenientes de diferentes especies, así como del número de marcadores utilizados (Barboza *et al*., 2018).

La heterocigosidad promedio observada y esperada calculadas a partir de las frecuencias alélicas estimadas por el método de De Silva e*t al*. (2005) fueron en 0,578 y 0,587 respectivamente. La heterocigosidad promedio encontrada es concordante con el trabajo de Guenaoui *et al.* (2013) al analizar la secuencia del espaciador ribosomal interno transcrito (ITS) de una colección de 29 accesiones de *Allium* conformado por 23 muestras de *A. ampeloprasum* silvestres, razas locales y cultivares de diferente origen y ploidia. Los autores reportaron 14 sitios heterocigotos en las accesiones hexaploides. Además, señalaron que esta naturaleza heterocigota en muestras hexaploides sería mantenida desde el origen de *A. ampeloprasum* var. *ampeloprasum*, el cual sería originada a partir de una cruza entre un genotipo común y ampliamente distribuido y un genotipo raro, ambos inmersos en el pool genético de *A. ampeloprasum*. De esta manera la descendencia generada maximizó la heterocigosidad y el vigor híbrido, los que una vez establecidos han sido propagados vegetativamente (dientes) siendo esta característica heterocigótica la que ha promovido su distribución como cultivo en el mundo. Así mismo, la presencia de gran divergencia intraindividual debido a la presencia de varios alelos diferentes en la secuencia ITS también ha sido reportado por Hirschegger *et al.* (2010) y Khedim *et al*. (2020), sin embargo, estos autores sostienen un origen alopoliploide de *A. ampeloprasum* var. *ampeloprasum*. De cualquier forma, sin importar si su origen es auto o alopoliploide, Guenaoui *et al*. (2013) y Hirschegger *et al.* (2010) sostienen que el polimorfismo intraindividual ha sido mantenido por la forma de propagación de *A. ampeloprasum* var*. ampeloprasum.*

El número de genotipos encontrados en la población conformada por las 23 accesiones de ajo chilote fue de 15, de los cuales el primer multilocus (MLG1) estuvo representado

por 236 muestras, este multilocus estuvo conformado por 11 accesiones totalmente clonales y por algunas muestras pertenecientes a diferentes accesiones. Los restantes multilocus estuvieron representados por 1 a 5 muestras. El que existan tantos individuos genéticamente idénticos entre las accesiones de ajo chilote se puede deber a que los agricultores en la región de los Lagos, específicamente en la Isla de Chiloé se abastecen de semillas de otros agricultores vecinos, compra en ferias y de cooperativas instaladas en la región con el fin de proteger el rendimiento del cultivo contra la degeneración causada por la forma de propagación (Registro de pasaporte de accesiones-INIA ,2019; Fundación para la Investigación Agraria, 2014; Li *et al*, 2021). Los 14 multilocus restantes representan valioso material genético, dado que son nueva fuente de diversidad, que deben ser conservados y evaluados en su potencial de convertirse en variedades de ajo chilote en el país. Resultados similares a los reportados en este estudio han sido obtenidos en una población conformada por 9 accesiones de "Aglione" o *A. ampeloprasum* var. *holmense* en Italia donde se encontró el mismo patrón, las accesiones formaron un grupo homogéneo, sin embargo, presentaron cierta variación genética interna (Terzaroli *et al*., 2021). El resultado obtenido también es respaldado por Guenaoui *et al.* (2013) quien menciona que la población de *A. ampeloprasum* var*. ampeloprasum* es bastante homogénea en el mundo, es decir, es una población poco diversificada, pero que su establecimiento en estos nuevos ambientes ha favorecido la acumulación de mutaciones somáticas.

Las relaciones entre los genotipos multilocus fueron analizados mediante un análisis jerárquico de cluster, agrupando los genotipos en 3 clusters. La accesión SCP1 (MLG15) es la genéticamente más distante y corresponde a una accesión recolectada en San Carlos, Región de Ñuble; el cluster II formado por los MLG 12 ,13 y 14, que en total agrupa a 6 individuos que proviene de las accesiones CH1, CH12, CH3 y el cluster III agrupó los MLG restantes representados en 259 individuos genéticamente cercanos. El agrupamiento generado entre las accesiones claramente muestra que no existe una relación con el origen geográfico de las mismas (Figura 1), lo cual está en acorde con la forma de obtención de semillas mencionado anteriormente. El mismo agrupamiento es consistente con la proporcionada por el análisis de coordenadas principales. Por otra parte, es diferente al resultado de estructura de la población obtenido mediante el método bayesiano el cual generó dos grupos. Sin embargo, es necesario mencionar que estos dos grupos coinciden con los dos cluster principales generados en el dendrograma.

Con respecto a estos resultados se considera que ambos agrupamientos son válidos y se complementan debido a que tienen un modo diferente de calcular la estructura y las relaciones genéticas de la población; en el caso de los análisis multivariados estos no asumen supuestos de equilibrio Hardy-Weinberg, no dependen de las frecuencias alélicas y no son afectados cuando el número de individuos que representan un grupo es pequeño. Por otro lado, los métodos paramétricos en el que se encuentra Structure basa su cálculo en varios supuestos genéticos como el equilibrio de Hardy-Weinberg y el equilibrio de ligamiento entre loci, además dependen de la estimación de las frecuencias alélicas las cuales son muy sensitivas al tamaño de la muestra (Odong et al., 2011; Alhusain *et al*., 2018).

El agrupamiento obtenido concuerda con Terzaroli *et al*. (2021) al analizar 9 accesiones de *A. ampeloprasum* var. *ampeloprasum* utilizando AFLP encontraron una estructura similar, formando estas 9 accesiones un cluster muy homogéneo, sin embargo, algunas muestras de una accesión se agruparon dentro de otras accesiones atribuyendo este resultado posiblemente al intercambio de semillas entre agricultores.

La escasa representatividad de los genotipos polimorficos, así como la mínima distancia genética encontrada entre los cluster 2 y 3 puede deberse a una posible reciente historia evolutiva. Similar a la reportada para la misma especie en Italia, específicamente en el valle Val-di Chiana, cuya introducción se reporta a los inicios del siglo XVI. Este tiempo relativamente corto puede limitar el potencial de acumulación de mutaciones y a su vez la aparición de polimorfismos marcadores dentro una variedad (Treu *et al.,* 2001). Investigación al respecto de la introducción de este cultivo a Chile nos permitirán afirmar esta hipótesis.

En términos generales los resultados del análisis de diversidad genética de la población de ajo chilote *(Allium ampeloprasum*) cultivado en la Isla de Chiloé, Chile, muestra una diversidad alélica y heterocigosidad de media a alta y una diversidad genotípica baja, lo cual está en acuerdo con Meloni *et al*. (2013) al señalar que la propagación clonal debería aumentar el número de alelos y heterocigosidad en una población, mientras que se espera un efecto opuesto sobre la diferenciación genética entre poblaciones y sobre la diversidad genotípica. Así mismo, es concordante con lo propuesto por Bengtsson (2003) quien menciona que las poblaciones clonales poseen una memoria eficaz de su historia genética anterior, de tal forma que una población que fue iniciada por propágulos

de origen sexual puede conservar su variación genotípica inicial durante un período muy largo de tiempo, incluso si posteriormente se reproduce exclusivamente de forma asexual.

V. CONCLUSIONES

Los marcadores ESTs- SSR y nSSR utilizados en este estudio permitieron caracterizar la diversidad de la población bajo estudio y determinar que la población de ajos de Chiloé posee una baja estructura genética, siendo todos los individuos genéticamente muy homogéneos. Existe un ecotipo predominante que podría ser caracterizado morfológica y agronómicamente y ser propuesto como una variedad local. Algo similar puede hacerse con el ecotipo de San Carlos que difiere del resto de los ecotipos de la Isla de Chiloé.

La diversidad encontrada podría ser mantenida conservando 15 individuos que representen a los 15 MLG. Se sugiere aumentar el número de marcadores para evaluar si estos resultados son consistentes.

Este es el primer reporte que utiliza el tipo de marcador tipo microsatélite para evaluar la diversidad genética dentro de una población de *A. ampeloprasum* var. *ampeloprasum.*

RESUMEN

El ajo chilote (*Allium ampeloprasum* L) es una especie hexaploide, infértil, que es propagado a través de bulbos. En Chile, es un cultivo tradicional que representa el 5% de la producción nacional de ajo, siendo cultivado principalmente en el sur del país. En el 2019 se realizó una recolección de 23 accesiones en campos de pequeños agricultores del sur de Chile con el fin de estudiar la diversidad genética de este cultivo. Para ello se utilizaron 20 marcadores moleculares tipo microsatélite, 11 derivados de secuencias expresadas (ESTs-SSR) y 9 de origen genómico (nSSR). Once de los 20 marcadores presentaron amplificación permitiendo determinar la existencia de 41 alelos en la población, con un promedio de cuatro alelos por locus. Los índices de diversidad Ho y He fueron 0,57 y 0,58 respectivamente, el PIC fue de 0,47. Las 266 muestras fueron agrupadas en 15 genotipos multilocus. El análisis de coordenadas principales y el análisis jerárquico de clúster utilizado para determinar las relaciones genéticas entre las accesiones, mostraron la existencia de tres grupos. El análisis de estructura genética detectó la presencia de dos grupos genéticos. Los resultados nos permiten indicar la existencia de una baja diferenciación genética en la población de A. ampeloprasum cultivado en la Isla de Chiloé siendo todos los individuos genéticamente muy homogéneos. Entre los 15 genotipos identificados existe uno predominante que podría ser caracterizado morfológica y agronómicamente y ser propuesto como una variedad local. La diversidad encontrada en esta población podría ser mantenida conservando 15 individuos que representen a los 15 multilocus.

VI. REFERENCIAS

Aranguiz, F. 2019. Caracterización de la diversidad genética de la colección de germoplasma de Allium sativum L. (ajo) de INIA. Tesis de pregrado. Escuela de Industria Alimentaria y Biotecnología, Universidad tecnológica Metropolitana de Chile. Santiago, Chile.

Alhusain, L., y Hafez, A. 2018. Nonparametric approaches for population structure analysis. Human Genomics 12:25.

Bailleul, D., Stoeckel, S y S. Arnaud-Haond. 2016. Rclone: a package to identify Multilocus Clonal Lineages and handle clonal data sets in R. Methods in Ecology and Evolution 7: 966–970.

Barboza, K., Beretta, V., Kozub, P., Salinas, C., Morgenfeld, C., Galmarini, C y Cavagnaro, P. 2018. Microsatellite analysis and marker development in garlic: distribution in EST sequence, genetic diversity analysis, and marker transferability across Alliaceae. Molecular Genetics and Genomics 293: 1091–1106.

Barboza, K., Salinas, M., Acuña, C., Bannoud, F., Beretta, V., Garcí-Lampasona, S., Burba, J., Galmarini, C y Cavagnaro, P. 2020. Assessment of genetic diversity and population structure in a garlic (*Allium sativum* L.) germplasm collection varying in bulb content of pyruvate, phenolics, and solids. Scientae Horticulturae 261.

Barra, M., Salazar, E., Beltrán, M., y Sagredo, B. 2012. Simple and robust DNA extraction method for the large-scale analysis of genotypes containing high polyphenolic content, such as landraces of *Solanum tuberosum* and *Zea mays*. Ciencia e Investigación Agraria 39 (3):593-601.

Bengtsson, B.2003. Genetic variation in organisms with sexual and asexual reproduction. Journal of Evolutionary Biology 16:189–199.

Besoain, X., Véjar, R. and Piontelli, E. 2002. Principales hongos fitopatógenos asociados a bulbos almacenados de ajo elefante *(Allium ampeloprasum* var*. holmense)* de la zona de Quillota y Nogales (Chile). En Boletín Micológico 17: 9 – 14.

Bruvo, R., Michiels, N., D'souza, T.y Schulenburg, H. 2004. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. Molecular Ecology *13*, 2101-2106.

Carneiro, M., Santini, L., Diniz, A y De Freitas, C. 2016. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. Genetics and Molecular Biology 39 (3): 312-328.

Catalán, P .2011. Ajo chilote: *Allium ampeloprasum*. Tierra Adentro. Nro. 96. Disponible en: https://biblioteca.inia.cl/handle/123456789/5276.

Clark, L y Schreier, A. 2017. Resolving microsatellite genotype ambiguity in populations of allopolyploid and diploidized autopolyploid organisms using negative correlations between allelic variables. Molecular Ecology Resources 17(5): 1090-1103.

Cloutier, S., Niu, Z., Datla, R and Duguid, S. 2009. Development and analysis of EST-SSRs for flax (L*inum usitatissimum* L.). Theoretical and Applied Genetics 119:53–63.

Cunha, C., Hoogerheide, E., Zucchi, M., Monteiro, M and Pinheiro, J. 2012. New microsatellite markers for garlic, *Allium sativum* (Alliaceae). American Journal of Botany, e17-e19.

Daza, P. A. 2005. Optimización de pasta de ajo chilote orgánica. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

De Silva, H.N., Hall, A.J., Rikkerink, E., McNeilage, M. A., y Fraser, L.G. 2005. Estimation of allele frequencies in polyploids under certain patterns of inheritance. Heredity (Edinb) 95:327–334.

Dey, P y Khaled, K. 2013. An Extensive Review on *Allium ampeloprasum* a Magical Herb. International Journal of Science and Research 4 (7):372-377.

Earl, D. A. and Von Holt, B. M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources 4 (2): 359-361.

Egea, L, García, R., Kilian, A., Hernández, P., and Dorado, G. 2017. Assessment of genetic diversity and structure of large garlic (*Allium sativum*) germplasm bank, by diversity arrays technology “Genotyping by sequencing” platform (Dartseq). Frontiers in genetics 8:88.

Evanno, G., Regnaut, S and Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. Molecular Ecology. 14:2611-2620.

Fundación para la Innovación Agraria-FIA. 2014. Ficha Iniciativa FIA. Recuperación y puesta en valor del patrimonio agroalimentario del ajo chilote (*Allium ampeloprasum*) a través de su saneamiento por multiplicación in vitro y obtención de semilla saneada disponible para la AF de Chiloé.

Friesen, N., Reinhard, F and Blattner, F. 2006. Phylogeny and new intrageneric classification of Allium (Alliaceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequences. Aliso 22: 372–395.

Fritsch, R. M., y Friesen, N. 2002. Evolution, domestication and taxonomy. ResearchGate. Genetics and Crop Plant Research (IPK), Corrensstr. 3, 06466 Gatersleben, Germany.

Guenaoui, C., Mang, S., Figliuolo, G and Neffati, M. 2013. Diversity in *Allium ampeloprasum*: from small and wild to large and cultivated. Genetic Resources and Crop Evolution 60: 97–114.

Hirschegger, P., Jakse, J., Trontelj, P. and Bohanec, B. 2010. Origins of *Allium ampeloprasum* horticultural groups and a molecular phylogeny of the section Allium (*Allium*: Alliaceae). Molecular Phylogenetics and Evolution 54: 488–497.

Huang, Z and Ren, J. 2013. Antibacterial Activity of Elephant Garlic and Its Effect against U2OS Human Osteosarcoma Cells. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 16: 10.

Ipek, M., Sahin, N., Ipek, A., Cansev, y Simon, P. 2015. Development and validation of new SSR markers from expressed regions in the garlic genome. Scientia Agricola 72:41-46.

Khedim, T., Ainouche, A., Amirouche, N., Ourari, M., Keller, J., Ainouche, M y Amirouche, R. 2020. Tracking the evolutionary history of the Allium ampeloprasum L. complex (section Allium) provides evidence of the contribution of North African diploids to the formation of allopolyploid horticultural groups. Genetic Resources and Crop Evolution 67: 1885–1904.

Kuhl, J., Cheung, F., Yuan, Q., Martin, W., Zewdie, J., McCallum, J., Catanach, A., Rutherford, P., Sink, K., Jenderek, M., Prince, J., Town, C y Havey, M. 2004. A unique set of 11,008 onion expressed sequence tags reveals expressed sequence and genomic differences between the monocot orders Asparagales and Poales. The Plant Cell 16:114–125.

Kumar, M , Sharma, V., Kumar, V., Sirohi, U., Chaudhary, V., Sharma, S., Saripalli, G., Naresh, R., Kumar, H., y Sharma, S. 2019. Genetic diversity and population structure analysis of Indian garlic (*Allium sativum* L.) collection using SSR markers. Physiology and Molecular Biology of Plants 25: 377–386.

Lee, G., Kwon, S., Parkc, Y., Lee, M., Kim, H., Lee, J., Lee, S., Gwag, J., Kima, C y Ma, K. 2011. Cross-amplification of SSR markers developed from Allium sativum to other Allium species. Scientia Horticulturae 128:401–407.

Li, X., Qiao, L. Chen, B., Zheng, Y., Zhi, C., Zhang, S., Pan, Y y Cheng, Z. 2021. SSR markers development and their application in genetic diversity evaluation of garlic *(Allium sativum* L.) germplasm. Plant diversity.

Mallor, M., Arnedo, M y Garcés, A. 2014. Assessing the genetic diversity of Spanish Allium cepa landraces for onion breeding using microsatellite markers. Scientia Horticulturae 170: 24–31.

Meirmans, P. 2021. GENODIVE version 3.0: Easy-to-use software for the analysis of genetic data of diploids and polyploids. Molecular Ecology Resources 20 ,1126-1131.

Meloni, M., Reid, A., Caujape´ -Castells, J., Marrero, A., Fernández, J., Mesa, A y Conti. E. 2013. Effects of clonality on the genetic variability of rare, insular species: the case of *Ruta microcarpa* from the Canary Islands. Ecology and Evolution 3(6): 1569–1579.

NCSS 2021 Statistical Software .2020. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA, ncss.com/software/ncss.

Odong, T.,Van Heerwaarden, J., Jansen, J., Van Hintum, J y Van Eeuwijk, F. 2011. Determination of genetic structure of germplasm collections: are traditional hierarchical clustering methods appropriate for molecular marker data? Theoretical and Applied Genetics 123:195–205.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. ODEPA. 2015. Estrategias Regionales de Competitividad por Rubro: Producción y Mercado del Ajo.

Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. ODEPA. 2018. El liderazgo de las mujeres campesinas en la conservación de la biodiversidad y la iniciativa SIPAM-Chiloé.

Pantoja, P., Simón-Pocar, V., Puzey, J y Vallejo, M. 2017. Genetic variation and clonal diversity in introduced populations of *Mimulus guttatus* assessed by genotyping at 62 single nucleotide polymorphism loci. Plant Ecology and Diversity 10(1): 5-15.

Paredes, M., Becerra, V y Gonzales, M. 2007. Low genetic diversity among garlic (*Allium sativum*) accessions detected using random amplified polymorphic DNA (Rapd*).* Chilean journal of agricultural research 68(1):3-12.

Peakall, R. y Smouse, P. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6:288-295.

Pertierra, Rosa., Peña, Gabriel y Muñoz, C.2020. Nutrición y fertilización del cultivo de ajo chilote en el Archipiélago de Chiloé. Osorno: Informativo INIA Remehue. no. 256. Disponible en: https://biblioteca.inia.cl/handle/123456789/67171.

Pritchard, J., Stephens, M., and Donnelly, P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. Genetics Society of America 155:945-95.

Qin-Qin,L, Song-Dong,Z., Xing-Jin, H.,*Yu-Cheng, Z, y Xian-Qin,W.2010. Phylogeny and biogeography of *Allium* (Amaryllidaceae: Allieae) based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast rps16 sequences, focusing on the inclusion of species endemic to China. Annals of Botany 106 (5): 709–733.

Ravinowitch, H. D., y Currah, L. 2002. Allium crop science: Recent advances.CAB International.

Registro de pasaporte de accesiones INIA .2019.

Sánchez, A. 2017. Estudio de la variabilidad genética en accesiones de papa (*Solanum tuberosum* L.) mediante marcadores SSRs. Ciencia y Agricultura 14(2):7.

Terzaroli, N., Marconi, G., Russi, L y Albertini, E.2021. Phenotypic and genetic characterization of “Aglione della Valdichiana: Population structure and genetic relationship analysis of a white gentle giant. Scientia Horticulturae 293:1-9.

Treu, R., Holmes, D., Smith, B., Astley, D., Johnson, M., y Trueman, L. 2001. *Allium ampeloprasum* var. *babingtonii* (Alliaceae): an isoclonal plant found across a range of habitats in S.W. England. Plant Ecology 155: 229-235.

Varshney, R., Grosse, L., Hahnel, U., Siefken, R., Prasad, M., Stein, N., Langridge, P., Altschmied, L y Graner, A.2006.Genetic mapping and BAC assignment of EST-derived SSR markers shows non uniform distribution of genes in the barley genome. Theoretical and Applied Genetics 113:239-250.

Wang, L., Li, S., Wang, T., He, C., Luo, H., Zhang, J y Zeng, Y. 2020. Genomic SSR and EST-SSR marker for phylogenetic and pedigree reconstructions- A comparison in sea buckthorm. Plant Breeding 140:167-183.

VII. ANEXOS

ANEXO 1. Composición de los multilocus generados

MULTILOCUS	MUESTRAS									
MLG1	CH1.1 CH1.2 CH1.3 CH1.4 CH1.5 CH1.6 CH1.7 CH1.9 CH1.10 CH1.16 CH1.17 CH1.18 CH1.19 CH1.20	CH2.1 CH2.2 CH2.3 CH2.4 CH2.5 CH2.6 CH2.7 CH2.8 CH2.9 CH2.10 CH2.11 CH2.12 CH2.13 CH2.14 CH2.15 CH2.16 CH2.17 CH2.18 CH2.19 CH2.20	CH3.1 CH3.2 CH3.3 CH3.5 CH3.7 CH3.8 CH3.11 CH3.12 CH3.13 CH3.14 CH3.17 CH3.18 CH3.19 CH3.20 CH3.21 CH3.22 CH3.23	CH4.1 CH4.3 CH4.5 CH4.7 CH4.8 CH4.9 CH4.10 CH4.11 CH4.12 CH4.13 CH4.14 CH4.15 CH4.16 CH4.17 CH4.18 CH4.19 CH4.20	CH5.1 CH5.2 CH5.3 CH5.4 CH5.5 CH5.6 CH5.7 CH5.8 CH5.9 CH5.10 CH5.11 CH5.12 CH5.13 CH5.14 CH5.15 CH5.16 CH5.17 CH5.18 CH5.19 CH5.20	CH6.1 CH6.2 CH6.3 CH6.4 CH6.5 CH6.6 CH6.7 CH6.8 CH6.9 CH6.10 CH6.11 CH6.13	CH7.1 CH7.2 CH7.4 CH7.5 CH7.6 CH7.7 CH7.8 CH7.9 CH7.10 CH7.11 CH7.12 CH7.15 CH7.18 CH7.19 CH7.20	CH8.1 CH8.2 CH8.3 CH8.4 CH8.5 CH8.6 CH8.7 CH8.8 CH8.9 CH8.10 CH8.11 CH8.12 CH8.13 CH8.14 CH8.15 CH8.16 CH8.17 CH8.18 CH8.19 CH8.20	CH9.1 CH9.3 CH9.5 CH9.6 CH9.7 CH9.8 CH9.9 CH9.10 CH9.11 CH9.12 CH9.13 CH9.14 CH9.15 CH9.16 CH9.17 CH9.18 CH9.20	CH10.1 CH10.2 CH10.3 CH10.4 CH10.5 CH10.6 CH10.7 CH10.8 CH10.9 CH10.10 CH10.11 CH10.12 CH10.13 CH10.14 CH10.15 CH10.16 CH10.17
	CH11.1 CH11.2 CH11.3 CH11.4 CH11.5 CH11.6 CH11.7 CH11.8 CH11.9 CH11.10 CH11.15 CH11.16 CH11.17 CH11.18 CH11.19 CH11.20 CH11.21 CH11.22 CH11.23	CH12.1 CH12.2 CH12.3 CH12.4 CH12.5 CH12.6 CH12.7 CH12.8 CH12.10 CH12.11 CH12.12 CH12.13 CH12.14 CH12.15 CH12.16 CH12.17 CH12.18 CH12.19 CH12.20	CH13.1 CH13.2 CH13.3	CH14.1 CH14.2 CH14.3	CH15.1 CH15.2 CH15.3 CH15.4	CH16.1 CH16.2 CH16.3	CH17.1 CH17.2 CH17.3	CH18.1 CH18.2 CH18.3 CH18.4 CH18.5 CH18.6 CH18.7 CH18.8 CH18.9 CH18.10	CH19.1 CH19.2	SCAG
MLG2				CH4.4		CH6.12				
MLG3	CH1.8									
MLG4	CH11.13 CH11.14	SCP2								
MLG5							CH7.3			
MLG6	CH1.14		CH3.9				CH7.14 CH7.17	PAI1.2		
MLG7	CH11.11 CH11.12									CH10.19 CH10.20

MLG8	CH1.15								CH7.13 CH7.16			
MLG9											CH9.2 CH9.4	
MLG10											CH9.19	
MLG11												CH10.18
MLG12	CH1.11 CH1.12	CH12.9	CH3.15									
MLG13			CH3.16									
MLG14	CH1.13											
MLG15	SCP1											

ANEXO 2. Composición alélica de los 15 multilocus

MLG	**Locus 1**	**Locus 2**	**Locus 3**	**Locus 4**	**Locus 5**	**Locus 6**	**Locus 7**	**Locus 8**	**Locus 9**	**Locus 10**	**Locus 11**	**Locus 12**
MLG 1	155 158 161 167	257 267 279	216	137 140 149 152 155	220 223 226	281 284	282 285 290 295 315	370 389	242 250	156 160 164 166 172	230	146 166
MLG 2	155 158 161 167	257 267 279	216	137 140 149 152 155	220 223 226	281 284	282 285 290 295 315	370 389	242 250	156 160 164 166 172	230	146
MLG 3	155 158 161 167	257 267 279	216	137 140 149 152 155	220 223 226	281 284	282 285 290 295 315	370 389	242 250	156 160 164 166 172	230	166
MLG 4	155 158 161 167	257 267 279	216	137 140 149 152 155	220 223 226	281 284	282 285 290 295 315	370 389	242 250	156 160 164 166	230	146 166
MLG 5	155 158 161 167	257 267 279	216	137 140 149 152 155	220 223 226	281 284	282 285 290 295 315	370 389	242 250	156 160 164 172	230	146 166
MLG	155	257	216	137	220	281	282	370	242	156	230	146

6	158 161 167	267 279		140 149 152 155	223 226	284	285 290 295 315	389	250	164 166 172		166
MLG 7	155 158 161 167	257 267 279	216	137 140 149 152 155	220 223 226	281 284	282 285 290 295 315	370 389	242 250	160 164 166	230	146 166
MLG 8	155 158 161 167	257 267	216	137 140 149 152 155	220 223 226	281 284	282 285 290 295 315	370 389	242 250	156 160 164 166 172	230	146 166
MLG 9	155 158 161 167	257 267	216	137 140 149 152 155	220 223 226	281 284	282 285 290 295 315	370 389	242 250	156 160 164 172	230	146 166
MLG 10	155 158 161 167	257 279	216	137 140 149 152 155	220 223 226	281 284	282 285 290 295 315	370 389	242 250	156 160 164 172	230	146 166
MLG 11	155 158 161 167	257 279	216	137 140 149 152 155	220 223 226	281 284	282 285 290 295 315	370 389	242 250	160 164 166 172	230	146 166
MLG 12	155 158 161 167	257	216	137 140 149 152 155	220 223 226	281 284	282 285 290 295 315	370 389	242 250	156 160 164 166 172	230	146 166
MLG 13	155 158 161 167	257	216	137 140 149 152 155	220 223 226	281 284	282 285 290 295 315	370 389	242 250	156 164 172	230	146 166
MLG 14	155 158 161 167	257	216	137 140 149 152 155	220 223 226	281 284	282 285 290 295 315	370 389	242 250	156 164	230	146 166
MLG 15	158 161	288 294	216	137 140 149 152	220 223	292	272 282	389	242 244	164 166	230 233	146 166