

ESCASA DIVERSIDAD GENÉTICA ENTRE ACCESIONES DE AJO (*Allium sativum* L.) DETECTADA MEDIANTE RAPDs¹

Low genetic diversity between garlic (*Allium sativum* L.) accessions detected using RAPD

Mario Paredes C.^{1*}, Viviana Becerra V.¹, María I. González A.¹

ABSTRACT

Garlic (*Allium sativum* L.) is a vegetative propagated species that shows a high morphological diversity. Besides, its clones have a specific adaptation to different agroclimatic regions. The objective of this study was to determine the genetic diversity of 65 garlic clones collected in Chile and introduced from different countries, by using RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Forty random primers of 10 mers generated a total of 398 bands with an 87% of polymorphism. Each primer amplified between two and 20 bands. The size of the fragments obtained fluctuated between 3.200 y 369 bp. The results showed that the clones analyzed presented 94% of genetic similarity. In addition, 70% of them were clustered in one major group. However, in spite that, several clones have different agronomic characteristics.

Key words: *Allium sativum*, germplasm, genetic diversity, RAPD marker.

RESUMEN

El ajo (*Allium sativum* L.) es una especie de propagación vegetativa, que presenta una amplia variabilidad morfológica. Los clones de esta especie tienen una adaptación específica a diferentes regiones agroclimáticas. El objetivo de este estudio fue determinar la diversidad genética existente en 65 clones de ajos colectados en Chile e introducidos desde diferentes países, utilizando RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar). Para esta evaluación se utilizaron 40 partidores al azar de 10-mers. Los partidores generaron entre dos y 20 bandas, observándose un alto número de patrones con bandas múltiples. Los fragmentos generados difieren en su tamaño entre 3.200 y 369 pb. Los partidores generaron 398 bandas, de las cuales un 87% fueron polimórficas. El análisis estadístico realizado detectó una similitud genética alta, de un 94% entre las accesiones evaluadas, donde aproximadamente un 70% de los clones formaron un grupo homogéneo. Sin embargo, este grupo incluye clones que presentan diferentes características agronómicas.

Palabras clave: *Allium sativum*, germoplasma, diversidad genética, RAPD.

¹ Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Casilla 426, Chillán, Chile. E-mail: mparedes@inia.cl *Autor para correspondencia
Recibido: 26 de abril de 2007. Aceptado: 6 de agosto de 2007.

INTRODUCCIÓN

Botánicamente, el ajo pertenece al género *Allium*, familia Alliaceae, que incluye importantes hortalizas como cebolla (*Allium cepa*), porro (*A. ampeloprasum*) y chalotas (*A. ascalonicum*). El ajo es una especie diploide ($2n = 2x = 16$), apomíctica obligada, por lo cual se reproduce vegetativamente (McCollum, 1987; Figliuolo *et al.*, 2001; Ipek *et al.*, 2003; 2005). Su centro de origen primario se encuentra en Asia Central (Kazakistán), y su centro secundario en la zona del Mediterráneo y el Cáucaso (Etoh y Simon, 2002).

El valor del ajo como cultivo ha sido reconocido desde épocas muy antiguas, ya que se estima que se ha cultivado por más de 5 000 años. Durante todo este tiempo ha sido usado como alimento, condimento y medicina por muchas civilizaciones en Asia y en la región Mediterránea (Ipek *et al.*, 2005). El contenido de ADN del ajo es de 32.7 pg por núcleo 2C (Ranjekar *et al.*, 1978), con una amplia variación en el kariotipo (Jones y Rees, 1968). El genoma del ajo presenta un bajo contenido de GC y una alta cantidad de ADN repetitivo (Kirk *et al.*, 1970). El primer mapa genético de baja densidad se obtuvo utilizando los polimorfismos de longitud de fragmento amplificado (AFLPs), y contiene 360 marcadores con un tamaño de 1 166 cM. Existe un segundo mapa con 321 marcadores y un tamaño de 862 cM (Ipek *et al.*, 2005).

Las diferentes especies de ajos se clasifican en cuatro grupos y un subgrupo: *longicuspis*, *ophioscorodon*, *sativum*, *subtropical* y el subgrupo *pekinense*. De los cuales el grupo *longicuspis* es considerado el más antiguo y se postula que es el origen de los otros tres grupos. El grupo *ophioscorodon* se distribuye en la zona Central de Asia, el grupo *sativum* en la zona mediterránea y el *subtropical* en el sur y sudeste de Asia. Finalmente, el subgrupo *pekinense* proviene del este Asiático (Maaß y Klaas, 1995).

A pesar de su infertilidad, el ajo posee una amplia variabilidad morfológica y agronómica en características tales como color y tamaño del bulbo, altura de planta, floración, número y tamaño de los bulbillos, madurez de cosecha, resistencia al almacenaje, dormancia y adaptación a condiciones agroclimáticas (Pooler y Simon, 1993b; del Pozo *et al.*, 1997; Lallemand *et al.*, 1997; Lopez *et al.*, 1997; Matus *et al.*, 1998; Figliuolo *et al.*, 2001).

El análisis de la variabilidad morfológica y fisiológica ha permitido la subdivisión de la especie *A. sativum* en dos grupos hortícolas: *sativum* (ajo común o mediterráneo) y *ophioscorodon* (ajo asiático) (Jones y Mann, 1963; Hanelt, 1990). Posterior a esta clasificación estos dos grupos se denominaron como subespecies, las que a su vez se dividen en diversos grupos o variedades. La subespecie *ophioscorodon* generalmente desarrolla tallos florales e incluye dos variedades: ‘Rocamble’ y ‘Continental’. La subespecie *sativum* no desarrolla tallos florales o lo hace de forma incompleta, y tiene tres subgrupos: ‘Artichoke’, ‘Silverskin’ y ‘Asiatic’ (Etoh y Simon, 2002).

La caracterización del germoplasma de ajo ha estado basada principalmente en características fenotípicas. Sin embargo, las características morfológicas pueden variar bajo condiciones agroclimáticas diferentes. Esta situación hace más compleja la caracterización de los clones de ajos (Bradley *et al.*, 1996; Al-Zahim *et al.*, 1997). Para eliminar algunas de estas limitaciones se han empezado a utilizar algunos marcadores bioquímicos (Pooler y Simon, 1993a; Lallemand *et al.*, 1997) y moleculares (Wilkie *et al.*, 1993; Bark, y Havey, 1995; Maaß y Klaas, 1995; D’Ennequin *et al.*, 1997; Dubouzet y Shinoda, 1999; García Lampasona *et al.*, 2003; Volk *et al.*, 2004; Rosales-Longo *et al.*, 2007, Ovesna *et al.*, 2007) en estudios de diversidad genética en esta especie.

Actualmente, el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) mantiene una colección de ajos naturalizados e introducidos al país, provenientes de diversas zonas agroecológicas. Este germoplasma ha sido evaluado por características agronómicas y fisiológicas (Del Pozo *et al.*, 1997; Matus *et al.*, 1998), con el fin de seleccionar material adaptado a las diferentes zonas productoras.

El objetivo de este estudio fue caracterizar genéticamente, mediante RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar), los clones de ajos mantenidos en el Banco de Germoplasma *ex situ* del INIA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se evaluaron 65 clones de ajo provenientes del Banco de Germoplasma del INIA, que se mantienen *ex situ* en el Campo Experimental Santa Rosa, Chillán (36°36` S; 72°06` O). Esta colección de genotipos está formada por clones colectados en el país y otros introducidos de diferentes regiones del mundo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Acciones de *Allium sativum* analizadas mediante ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD).

Table 1. *Allium sativum* accessions analyzed by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).

N° accesión	Clon	País de origen	Lugar o región de colecta	Latitud	Longitud
2	Taiwan Kakis	EE.UU.	Llay-Llay	32°50'	70°56'
3	México Blanco Kakis A	México	Llay Llay	32°50'	70°56'
4	Lluteño	Chile	Lluta	18°30'	70°20'
5	México Criollo Kakis A	México	Llay-Llay	32°50'	70°56'
6	Taiwan Básico	México	Llay-Llay	32°50'	70°56'
7	Nirivilo	Chile	Constitución	35°19'	72°25'
8	Talca	Chile	Constitución	35°19'	72°25'
9	México Criollo Kakis B	EE.UU.	Llay Llay	32°50'	70°56'
10	México Blanco Básico	EE.UU.	Llay-Llay	32°50'	70°56'
11	Egipto Básico	EE.UU.	Llay Llay	32°50'	70°56'
13	Constitución	Chile	Constitución	35°19'	72°25'
14	Blanco Maipú	Chile	Llay Llay	32°50'	70°56'
15	Blanco Mendoza	Chile	Llay Llay	32°50'	70°56'
16	Blanco Camiña	Chile	Camiña	19°18'	69°25'
17	Rojo Maipú	Argentina	Maipo	33°43'	70°47'
18	Rosado Nortino I R	Chile	Arica	18°29'	70°17'
19	Rosado Camiña	Chile	Camiña	19°18'	69°25'
20	Morado Ariqueño	Chile	Arica	18°29'	70°17'
21	Rosé de Lautrec	Francia	Paine	33°49'	70°45'
22	Morado Ruso	Chile	Temuco	38°43'	72°34'
23	Rosado Copiapino	Chile	Copiapó	27°21'	70°20'
24	Messidrome	Francia	Paine	33°49'	70°45'
25	Antofagasta	Chile	Calama	22°26'	68°55'
26	Quepe	Chile	IX Región	38°52'	72°36'
27	Carrarreñi	Chile	IX Región	--	--
28	Los Boldos	Chile	IX Región	39°08'	73°07'
29	Pircunche	Chile	IX Región	--	--
30	El Palqui	Chile	El Palqui	--	--
31	Rosado Argentino	Argentina	Llay Llay	32°50'	70°56'
32	Blanco Argentino Ocoa	Argentina	Llay Llay	32°50'	70°56'
33	CAR	Chile	Chillán	36°35'	72°06'
34	Camiña Vallenar	Chile	Vallenar	28°34'	71°45'
35	Chile Chico	Chile	X Región	46°32'	71°43'
36	Rosado Chileno	Chile	Llay Llay	32°50'	70°56'
37	Imperial	Chile	IX Región	38°44'	72°57'
38	Chol Chol	Chile	IX Región	38°36'	72°50'

39	Uruguay GLB	Uruguay	Chillán	36°35'	72°06'
40	Cato	Chile	Chillán	36°35'	72°06'
42	Uruguay 1A-2	Uruguay	Chillán	36°35'	72°06'
43	Uruguay 1A-12	Uruguay	Chillán	36°35'	72°06'
44	Uruguay LB-13	Uruguay	Chillán	36°35'	72°06'
45	Rosado Chillán	Chile	Chillán	36°35'	72°06'
46	Arica	Chile	Arica	18°29'	70°17'
47	Rosado Criollo Iscayachi	Bolivia	Tarija	21°31'	64°44'
48	Rosado Marfil Criollo	Bolivia	Tarija	21°31'	64°44'
49	Rosado INIA	España	Tarija	21°31'	64°44'
50	Rosado Palqueño	Bolivia	Tarija	21°31'	64°44'
51	Rosado Argentino Iscayachi	Bolivia	Tarija	21°31'	64°44'
52	Chino	China	Llay-Llay	32°50'	70°56'
53	Rojo Peruano	Chile	Arica	18°29'	70°17'
54	Egipto	Chile	Llay-Llay	32°50'	70°56'
55	Centenario	Brasil	Brasilia	--	--
56	Río Grande Calama	Chile	Calama	22°26'	68°55'
57	Calle Chica	Chile	Calama	22°26'	68°55'
58	Blanco Andino	Chile	Calama	22°26'	68°55'
59	Ruso Coyhaique	Chile	Temuco	38°43'	72°34'
61	Fukuchi White	Japón	Japón	--	--
62	California Late	EE.UU.	EE.UU.	--	--
63	Blanco El Natre	Chile	Araucanía	--	--
64	Blanco Imperial	Chile	Araucanía	38°44'	72°57'
65	Blanco Nahuelbuta	Chile	Araucanía	--	--
66	Blanco Araucano	Chile	Araucanía	--	--
67	Huichahue	Chile	Araucanía	--	--
68	Blanco Cañete	Chile	Cañete	37°48'	73°24'
69	Rondadero	Chile	Chillán	36°35'	72°06'

IX Región: Región de La Araucanía; X Región: Región de los Lagos

Metodología

Extracción de ADN. El ADN total se extrajo a partir de hojas sanas, previamente almacenadas a -85 °C. Las muestras se maceraron en nitrógeno líquido y se incubaron a 65 °C por 1 h con el buffer de extracción SDS pH 9,5 (Tris 50 mM, NaCl 0,7 M, EDTA 10 mM, SDS 1%, β-mercaptoetanol 1% y PVPP 5%) (Becerra-Velásquez y Gepts, 1994). Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 5.000 rpm para la separación de las fases. La fase acuosa se extrajo con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) por dos veces y se centrifugó a 5.000 rpm por 15 min. El ADN se precipitó con isopropanol y el pellet de ADN se lavó en alcohol 76% y acetato de amonio (10 mM). Finalmente, el pellet se secó y resuspendió en TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). El ADN se cuantificó en un fluorómetro DyNA QuantTM 200 (Hoeffer, San Francisco, USA) y las muestras se diluyeron a 5 ηg μL⁻¹). Para verificar la calidad del ADN se realizó una electroforesis en agarosa al 1%; usando λ *Hind*III como referencia del tamaño de fragmentos.

Caracterización genética. La caracterización genética se realizó mediante RAPD, para lo cual se utilizaron 40 partidores de RAPDs (10 mers) de las series OPA 01-20 y OPB 01-20 (Operon Technologies, Alameda, California, USA). Las condiciones de amplificación se optimizaron hasta obtener una alta reproducibilidad y nitidez en el patrón de bandas. El volumen de reacción fue de 25 μL, los cuales contenían Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, MgCl₂ 1,0 mM, KCl 50 mM, 0,4 μM de partidador, 1 unidad de Taq-polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), dNTPs 0,05 mM y 25 ηg de ADN molde.

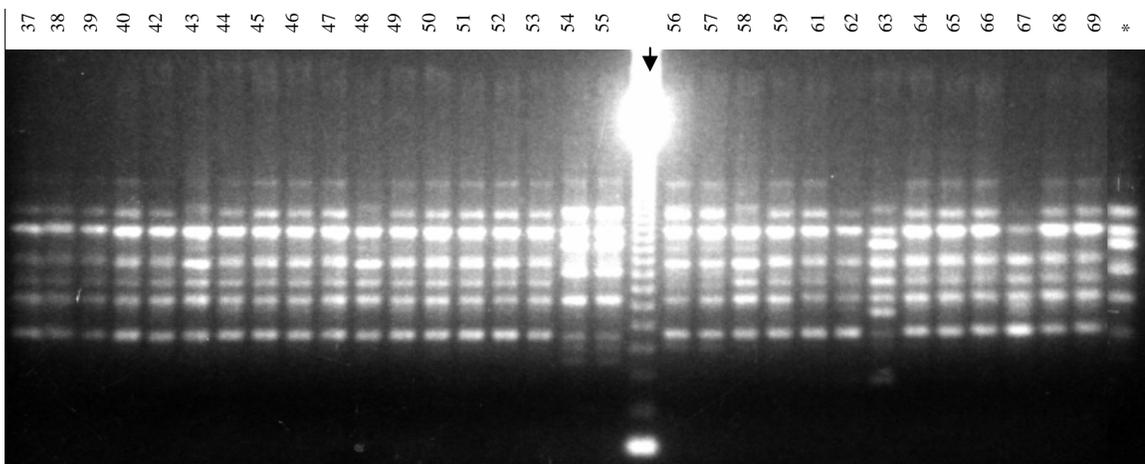
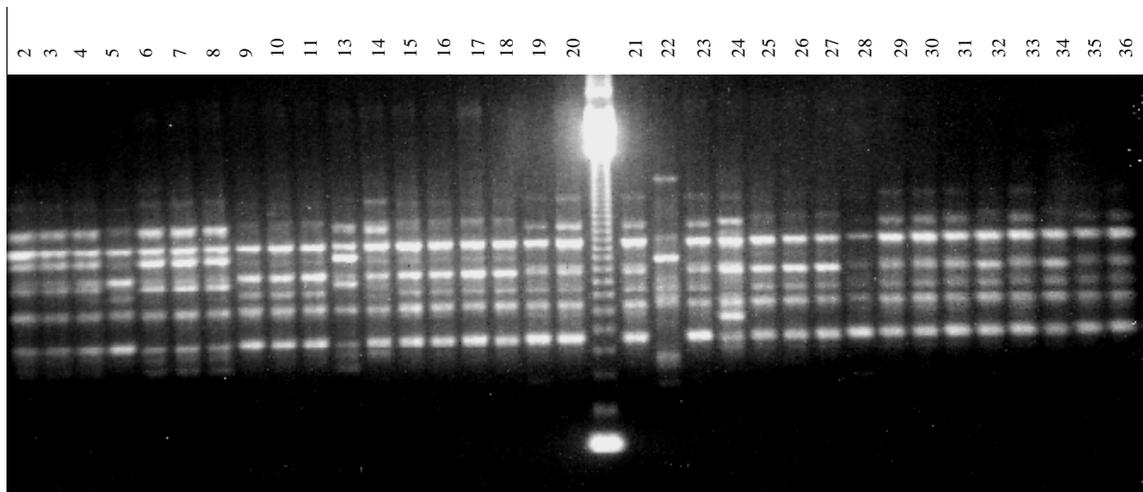
Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: tres ciclos iniciales de 95 °C por 1 min, 48 °C por 1 min, 72 °C por 2 min, continuando con 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 48 °C por 40 s, 72 °C por 2 min, y un período de extensión de 72 °C por 10 min (Termociclador PTC-220, MJ Research, Watertown, Massachusetts, USA). El producto de la amplificación se separó por electroforesis en geles de agarosa (2%) en 1 X TAE (Tris acetate 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) a 100 V por 3,5 h, seguido por una tinción con bromuro de etidio. Los geles se visualizaron y fotografiaron bajo luz ultra violeta para su evaluación (Transluminador MacroVue™, Hoefer, San Francisco, California). Todas las amplificaciones se realizaron en duplicado para verificar la estabilidad de los resultados.

Análisis de los datos. Para la evaluación de los resultados se registraron sólo bandas nítidas y reproducibles. Cada banda se consideró como un carácter independiente y se contabilizó en forma cualitativa por su presencia (1) o ausencia (0), generando una matriz binaria. La similitud genética entre pares de genotipos se estimó usando el coeficiente de similitud de Jaccard con la opción SIMQUAL. La matriz de similitud se calculó mediante el método de agrupamiento secuencial, aglomerativo y jerárquico (Sequential, agglomerative, hierarchical and nested clustering) (SAHN) (Sneath y Sokal, 1973). El dendrograma se generó por el método jerárquico y el algoritmo de agrupamiento UPGMA. Se usó la opción COPH para generar una matriz de valores cofenéticos. Esta matriz se usó en la opción MXCOMP para calcular la correlación entre la matriz de correlación cofenética y la matriz de agrupamiento original (SIMQUAL). Este análisis mide si los datos originales están representados en el análisis de agrupamiento con 1 000 permutaciones, lo cual genera un valor de correlación cofenético (r). Se considera que un valor de correlación de $r = 0,9$ tiene un buen ajuste (Mantel, 1967). Estos análisis se realizaron mediante el programa NTSYSpc 2.1 program (Rohlf, 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La planta de ajo se ha propagado vegetativamente por muchos siglos, por lo tanto la presencia de clones estrechamente relacionados genéticamente y la presencia de duplicaciones en los Bancos de Germoplasma, son dos hechos posibles de constatar. En este sentido, un marcador como RAPD que no requiere información previa de partidores o de secuencias de ADN de la especie, podría ser de gran utilidad para evaluar la diversidad genética de los clones de ajos de un Banco de Germoplasma (Maaß y Klaas, 1995; Al-Zahim *et al.*, 1997; Etoh *et al.*, 2001; Ipek *et al.*, 2003).

En este estudio, el análisis de los 40 partidores de RAPDs generó un total de 398 bandas, de las cuales 87% detectaron polimorfismo. El número total de bandas por partidador fluctuó entre 2 (OPA-4) y 20 (OPA-19), con un tamaño entre 3.200 y 369 pares de bases (pb), de acuerdo al ADN estándar (**Figura 1**).



* *Allium ampeloprasum* L.

Figura 1. Patrones de ADNs polimórficos amplificados al azar (RAPDs) generados por el partidor OPA-11 en 65 clones de *Allium sativum*, marcador estándar (↓) de 123 pares de bases (pb).

Figure 2. Banding pattern of 65 *Allium sativum* clones generated with OPA-11 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) primer and ladder (↓) of 123 bp.

Debido al alto número de bandas que detectaron polimorfismo (346) en este análisis, se puede decir que los RAPDs dieron una buena aproximación de la relación genética existente entre los clones evaluados. En este aspecto se asume que los fragmentos de ADN amplificados (amplicones) que co-migran en las diferentes accesiones son similares en su secuencia. Wilkie *et al.* (1993) aislaron y analizaron varias bandas de RAPDs comunes de ajos y analizaron su homología a través de un proceso de hibridación de ADN bajo dos tipos de astringencia, baja y media-alta. Los resultados obtenidos indicaron que todas las bandas comunes de RAPDs aisladas, de similar intensidad, poseían una alta homología. Sin embargo, algunas de estas bandas comunes presentaron en el gel señales de hibridación con diferente fuerza, lo que indicaría la existencia de algunas diferencias en la homología de las secuencias. Por tal razón, para el

análisis genético del producto de las amplificaciones, sólo se evaluaron bandas de similar intensidad, consistentes y claras. Un estudio similar realizado en *Brassica* y *Helianthus* indicó que los posibles errores de homología de los amplicones de RAPDs era el azar y que tenían un efecto muy pequeño en la similitud promedio de los genotipos analizados (Adams y Reiseberg, 1998). Otro estudio realizado con amplicones de AFLP en ajos, indicó que un 95,4% de los fragmentos eran idénticos o bien que poseían una alta homología a nivel de secuencia de ADN (Ipek *et al.*, 2006).

El análisis de agrupamiento basado en los datos de RAPDs indicó que existe una escasa diversidad genética entre los clones analizados (**Figura 2**), aunque se detectó un alto número de bandas que detectaron polimorfismo. Esta situación se puede deber a que la mayoría de estas bandas polimórficas se presentaron en una baja frecuencia en los genotipos evaluados. Los coeficientes de similitud de los genotipos analizados permitieron generar un dendrograma con dos grupos. El primero de ellos incluyó un total de 44 clones (68%). Este grupo es homogéneo, con una similitud genética de 100% para los partidores de RAPD analizados. Dentro de este grupo se encuentran clones de origen diverso, colectados tanto en el país como en el extranjero.

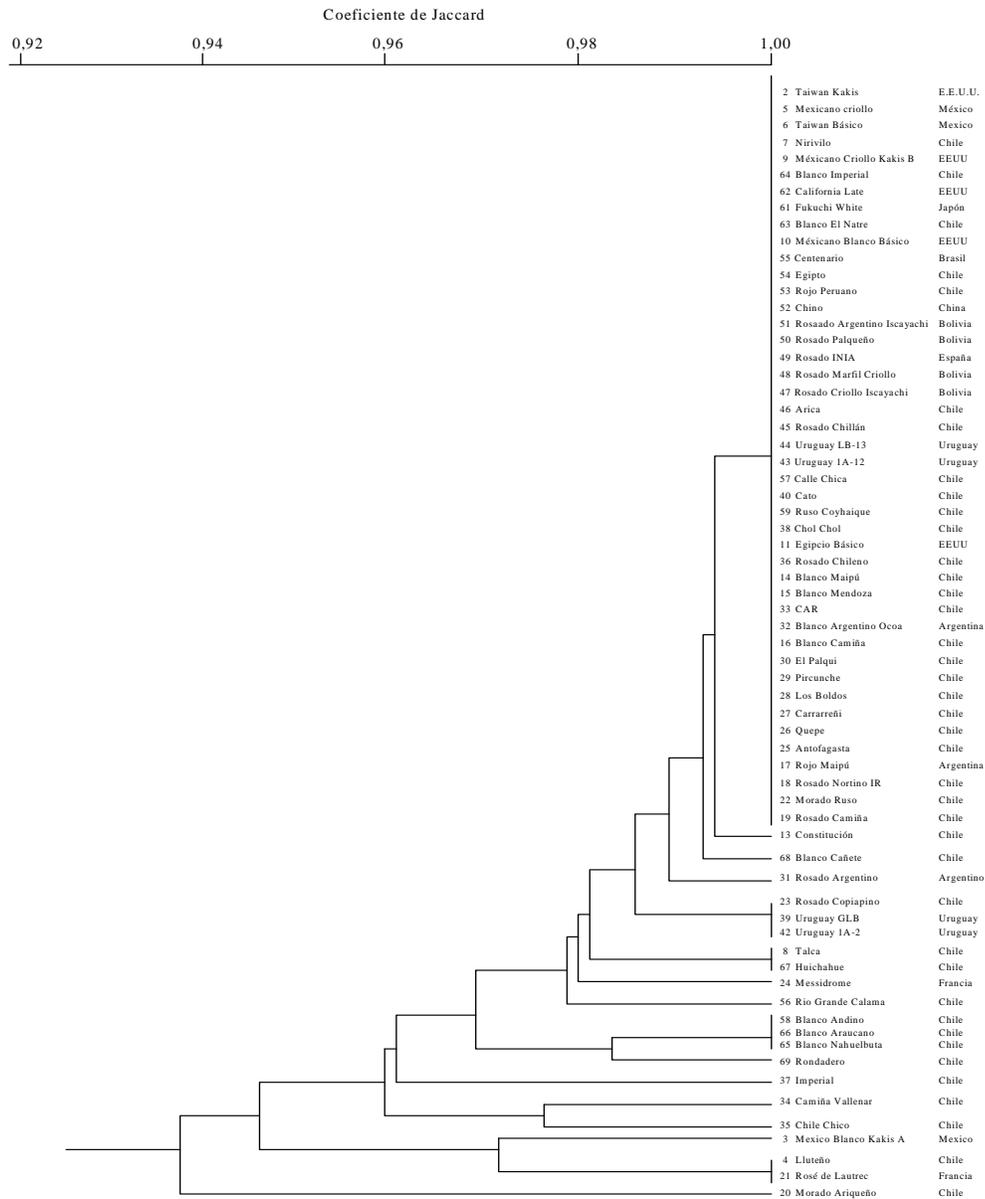


Figura 2. Dendrograma generado por el análisis de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) en 65 clones de *Allium sativum* colectados en Chile.

Figure 2. Dendrogram constructed from Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) data of 65 *Allium sativum* clones collected in Chile.

La escasa diversidad genética contrasta con la alta variabilidad fenotípica que presenta esta especie (Bradley *et al.*, 1996; Pooler y Simon, 1993a; Matus *et al.*, 1998; Ipek *et al.*, 2003; Volk *et al.*, 2004). Esta alta variabilidad fenotípica se podría explicar por una intensa presión de selección durante el proceso de domesticación de la especie, la presencia de su posible progenitor (*A. longicuspis*) que se reproduce sexualmente (Koul *et al.*, 1997), infección por virus y viroides, alta respuesta a condiciones climáticas diferentes, especialmente fotoperíodo y temperatura, y a la sinonimia de algunos cultivares (Bradley *et al.*, 1996; Ipek *et al.*, 2003), mutaciones (Koul *et al.*, 1997; Volk *et al.*, 2004), crossing-over somáticos y variación somaclonal producida a través del cultivo *in vitro* de los clones (Ordoñez *et al.*, 2002).

En el material evaluado en este estudio, existen clones que emiten tallo floral (Rosado Argentino Iscayachi, Rosado INIA, Uruguay LB-13, CAR, Rojo Maipú, Rosado nortino IR, Morado Ruso y Rosado Camiña), mientras que otros no lo hacen (California Late, Calle Chica, Ruso Coyhaique, Chol Chol, Pircunche, Los Boldos, Carrarreñi y Quepe) (Matus *et al.*, 1998). Este aspecto es importante, ya que se ha comprobado que la emisión de tallo floral es una característica relativamente estable (Etoh y Simon, 2002). Un análisis previo con RAPDs de genotipos colectados en otras regiones geográficas (Al-Zahim *et al.*, 1997), discriminó un grupo de accesiones que emitían tallo floral de las que no lo hacían. Para las condiciones de este estudio, no se detectó esta asociación y una posible explicación es que se usaron diferentes genotipos y partidores de RAPD.

Se observa que en el segundo grupo conformado por los 21 clones restantes (16,9%), éstos se presentaron en forma individual, con una mayor diversidad en RAPD. Sin embargo, el nivel de esta diversidad genética sigue siendo bajo, ya que su porcentaje de similitud fluctuó entre el 94 y 98% (**Figura 2**). Dentro de este grupo también se encontraron clones de diferente origen y con características fenotípicas variables. Por ejemplo, algunos de estos clones emiten siempre un tallo floral (Uruguay GLB y Camiña Vallenar), mientras que otros no lo emiten (Blanca Cañete, Huichahue, Blanco Andino, Rondadero, Chile Chico y Rosé de Lautrec) (**Figura 2**). El coeficiente de correlación cofenético entre la matriz cofenética y los datos originales de los RAPDs fue de 0,98, lo que indica que la matriz original está bien representada en el dendrograma.

Por otro lado, algunos clones que son genéticamente similares en este estudio (clones Talca y Huichahue; Rosado Copiapino, Uruguay GLB y Uruguay 1A-2) (**Figura 2**), lo son también en sus características fenotípicas (Matus *et al.*, 1998). Esta situación confirma una escasa asociación entre la diversidad genética y la fenotípica, lo que se puede deber a que los RAPD detectan diferencias de secuencias distribuidas al azar en el genoma y que no están necesariamente asociadas a las características fenotípicas. Otro aspecto importante de considerar en estudios de diversidad genética, es que las características fenotípicas, a pesar de su importancia agronómica, mayoritariamente están controladas por un número reducido de genes y, por lo tanto, su representatividad en el genoma es escasa, en comparación con los marcadores moleculares, que debido a su abundancia pueden representar en mejor forma la diversidad del material analizado.

Es posible destacar que la uniformidad genética de los clones de ajo observada a nivel molecular, está de acuerdo a lo esperado debido al sistema de reproducción vegetativa de la especie y posibles duplicaciones en el germoplasma. Volk *et al.* (2004) detectaron que un 41% de los clones estaban duplicados en una colección de ajos del Banco de la Estación Occidental de Introducción de Plantas, ubicada en Pullman, Washington, EE.UU., perteneciente al Sistema Nacional de Germoplasma. Antes de eliminar posibles duplicaciones en este germoplasma, sería recomendable usar otros marcadores complementarios a los RAPDs antes de tomar una decisión.

En ausencia del proceso sexual en la propagación del ajo, las mutaciones al azar e inducidas han sido la única fuente de variabilidad genética en los programas de mejoramiento genético (Volk *et al.*, 2004). Otra alternativa para aumentar la variabilidad de características económicas en un programa de mejoramiento de la especie, es la introducción y selección de nuevos genotipos (accesiones) de ajos, inducción de poliploides, mutaciones (Koul *et al.*, 1997) y la producción de semilla verdadera (Kamenetsky *et al.*, 2004). Este proceso fue obtenido en Japón (Etoh, 1997) Alemania (Konvicka, 1984, citado por Simon, 1993) y Estados Unidos (Pooler y Simon, 1993a; Jenderek y Hannan, 2004). Este hecho abre una nueva y amplia posibilidad en el mejoramiento genético de esta especie en el futuro (Simon, 1993; Koul *et al.*, 1997).

En este sentido, la reproducción sexual en algunas accesiones de ajos podría ser utilizada para mejorar el rendimiento, tolerancia a las condiciones bióticas y abióticas, y calidad y producción de plantas libres de virus (Kamenetsky *et al.*, 2004).

La escasa diversidad genética presente en la colección chilena comparada con la existente en los países de origen de esta especie, se podría explicar en parte por el origen del material colectado y mantenido como germoplasma. El germoplasma evaluado contiene accesiones colectadas en América (Chile, EE.UU., México, Bolivia, Uruguay, Argentina), Europa (España, Francia) y Asia (China, Japón), ninguno de los cuales es centro de origen de la especie. En este sentido, lo más probable es que el material colectado en Chile haya sido introducido previamente desde algunos de los países mencionados anteriormente, y no directamente del centro de origen de la especie (Asia Central) o llamado también centro de diversidad. Una característica que comparten casi todas, sino todas las plantas domesticadas, es una reducción de la diversidad genética durante y después de la domesticación (Gepts, 2004; Zeder *et al.*; 2006). La magnitud del “cuello de botella” depende del número de individuos de la población fundacional y de la duración del cuello de botella (Zeder *et al.*, 2006). Este fenómeno de cuello de botella ha sido medido a través de marcadores bioquímicos (isoenzimas, proteínas de almacenaje) o moleculares (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción [RFLP], RAPD, AFLP) y recientemente datos de secuencias de ADN (Hyten *et al.*, 2006). En este proceso, cada evento de introducción de material genético a un país determinado toma una muestra reducida de accesiones con características bien definidas, por lo tanto introduce sólo una parte muy limitada de la diversidad presente en el centro de origen de la especie (Lallemand *et al.*, 1997). Estos resultados han sido confirmados recientemente por Etoh *et al.* (2001), quienes compararon la diversidad genética de accesiones provenientes del centro de origen del ajo y de accesiones provenientes de una región fuera de este centro. Los resultados obtenidos indicaron una mayor diversidad genética entre accesiones de ajos colectados en el Asia Central, centro primario de origen de la especie, y una mayor similitud genética entre las accesiones provenientes de la Península Ibérica, España y Portugal.

La presencia de una mayor variabilidad morfológica en las accesiones en comparación con los datos moleculares se puede explicar a que estos dos tipos de datos han estado sujetos probablemente a diferentes factores evolutivos. Los marcadores moleculares son generalmente neutros y pueden estar sujetos a deriva genética, mientras que los datos fenotípicos están expuestos a la selección natural y artificial. A mayor adaptación de la característica seleccionada mayor es su probabilidad de sobrevivir en el tiempo (Gepts, 2004). En este sentido, características que poseen una alta heredabilidad pueden causar un fuerte impacto en la mantención de la diversidad fenotípica. Figliuolo *et al.* (2001) determinaron altos valores de heredabilidad en el sentido amplio, mayores a 60% para altura de la planta y altura del cuello. Además, indicaron que la altura de la planta estaba altamente correlacionada con el peso del bulbo y su diámetro. Es así que a través del tiempo se han seleccionado dos tipos de ajos, uno con un alto número de pequeños dientes por bulbo y otro de mayor tamaño con un menor número de dientes. Sin embargo, es posible encontrar algunas accesiones que poseen un alto número de dientes con un alto peso del bulbo. Por otro lado, esta fuerte presión de selección sobre características agronómicas no afecta, en muchos casos, las secuencias de RAPD u otros marcadores (neutrales), a menos que estas secuencias estén ligadas a estas características fenotípicas, agronómicas y/o adaptativas. Esta misma situación se ha observado a nivel bioquímico en la especie. Un estudio realizado en una colección de clones proveniente de 25 países, utilizando marcadores bioquímicos, determinó también una escasa variabilidad isoenzimática para 65 clones evaluados (Lallemand *et al.*, 1997). Aparentemente, la escasa variabilidad entre los grupos de ajos se debió solamente a la presencia de una o pocas mutaciones, las cuales no han sido acompañadas por cambios importantes en el resto del genoma (Lallemand *et al.*, 1997).

El hecho que no exista una asociación entre la diversidad genética de los ajos naturalizados en Chile con el lugar de colecta, se puede deber al fenómeno de intercambio de material entre las diferentes zonas geográficas, o a que las situaciones edafoclimáticas no son tan contrastantes como para que el proceso de selección natural y artificial pueda favorecer una formación de clones adaptados a determinadas regiones del país y la imposibilidad de trazar el origen primario de estos clones. Esta ausencia de correlación entre diversidad genética y lugar de colecta fue obtenida también por Ipek *et al.* (2003) y Volk *et al.* (2004). Un estudio realizado por Rosales-Longo *et al.* (2007), donde se compararon 43 accesiones de ajo tipo

“chileno” y 27 tipo “criollo”, utilizando AFLP, determinaron que las accesiones de ajo tipo “chileno” poseía una menor diversidad genética que las accesiones clasificadas como tipo “criollo”.

Aunque la diversidad genética detectada por los RAPD en los clones del grupo 2 es escasa, indica que es posible detectar secuencias genéticas que pueden identificar a algunos de estos clones. Esta información podría ser bastante útil para complementar la información morfológica y agronómica necesaria para la inscripción de alguno de estos clones en el Registro de Variedades Protegidas, mantener la pureza varietal y hacer valer los derechos de los obtentores. Sin embargo, para mejorar el proceso de identificación de estos clones, es necesario incorporar otro tipo de marcadores moleculares que permitan detectar mayores diferencias genéticas entre ellos. En este sentido, Ipek *et al.* (2003) y Volk *et al.* (2004) señalan que los AFLPs han sido útiles para diferenciar clones de ajos que no habían podido ser individualizado con RAPD e isoenzimas. Este punto es de especial importancia para la diferenciación de los clones ubicados en el primer grupo del dendrograma (**Figura 2**). Sin embargo, Ipek *et al.* (2003) indican que al comparar los grupos de accesiones de ajos de los dendrogramas (confeccionados con el método UPGMA), de AFLP y de RAPD mostraron una correlación de 96% entre ellos.

Desde el punto de vista productivo, y debido a la escasa variación genética observada en el germoplasma presente en la zona centro-sur, es altamente recomendable seleccionar varios clones que tengan diferentes niveles de diversidad genética para ser entregados a los agricultores. De esta manera, se podría ayudar en parte a reducir los posibles problemas de vulnerabilidad genética que pudieran enfrentar estas selecciones frente a diversos factores adversos.

CONCLUSIONES

1. El análisis molecular mediante la técnica de RAPDs detectó una baja diversidad genética del germoplasma de ajo presente en Chile.
2. No se detectó una relación específica entre los patrones generados por los partidores utilizados y el origen geográfico de los clones.
3. No existió una relación de asociación clara entre la diversidad morfológica y la diversidad genética detectada a través de RAPDs.

RECONOCIMIENTOS

Los autores desean agradecer el financiamiento del INIA para desarrollar esta investigación y a la Srta. Patricia Herrera por su colaboración en el muestreo del germoplasma evaluado.

LITERATURA CITADA

- Adams, R.P., and L.H. Rieseberg. 1998. The effects of non-homology in RAPD bands on similarity and multivariate statistical ordination in *Brassica* and *Helianthus*. *Theor. Appl. Genet.* 97:323-326.
- Al-Zahim, M., H.J. Newbury, and B.V. Ford-Lloyd. 1997. Classification of genetic variation in garlic (*Allium sativum* L.) revealed by RAPD. *HortScience* 32:1102-1104.
- Bark, O.H., and M.J. Havey. 1995. Similarities and relationships among populations of the bulb onion as estimated by nuclear RFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 90:407-414.
- Becerra-Velásquez, V., and P. Gepts. 1994. RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in its centres of origin. *Genome* 37:256-263
- Bradley, K.F., M.A. Rieger, and G.G. Collins. 1996. Classification of Australian garlic cultivars by DNA fingerprinting. *Aust. J. Exp. Agric.* 36:613-618.
- Del Pozo, A., M.I. González, and C. Barraza. 1997. Phenological development of 13 clones of garlic (*Allium sativum*): Influence of temperature, photoperiod and cold storage. *Acta Hort. (ISHS)* 443:389-394.
- D'Ennequin, M., O. Panaud, T. Robert, and A. Ricroch. 1997. Assessment of genetic relationships among sexual and asexual forms of *Allium cepa* using morphological traits and RAPD markers. *Heredity* 78:403-409.
- Dubouzet, J.G., and K. Shinoda. 1999. Relationships among old and new world *Alliums* according to ITS DNA sequence analysis. *Theor. Appl. Genet.* 98:422-433.
- Etoh, T. 1997. True seeds in garlic. *Acta Hort. (ISHS)* 433:247-255.
- Etoh, T., and P.W. Simon. 2002. Diversity, fertility and seed production of garlic. p. 101-117. *In* Rabinovitch, H.D., and L. Currah (eds.) *Allium* crop science: Recent advances. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Etoh, T., H. Watanabe, and S. Iwai. 2001. RAPD variation of garlic clones in the center of origin and the westernmost area of distribution. *Mem. Fac. Agr. Kogoshima Univ.* 37:21-27.
- Figliuolo, G., V. Candido, G. Logozzo, V. Miccoli, and P.L. Spagnoletti-Zeuli. 2001. Genetic evaluation of cultivated garlic germplasm (*Allium sativum* L. and *A. ampeloprasum* L.). *Euphytica* 121:325-334.
- García Lampasona, S., L. Martínez, and J.L. Burba. 2003. Genetic diversity among selected Argentinean garlic clones (*Allium sativum* L.) using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). *Euphytica* 132:115-119.
- Gepts, P. 2004. Crop domestication as a long-term selection experiment. *In* J. Janick (ed). *Plant Breed. Rev.* 24:1-44.
- Hanelt, P. 1990. Taxonomy, evolution, and history. p. 1-26. *In* Rabinovitch, H.D., and J.L. Brewster (eds.) *Onions and allied crops. Vol. 1. Botany, physiology, and genetics.* CRC, Boca Raton, Florida, USA.

- Hyten, D.L., Q. Song, Y. Zhu., I.Y. Choi, R.L. Nelson, J.M. Costa, *et al.* 2006. Impacts of genetic bottlenecks on soybean genome diversity. PNAS 103:16666-16671. Available at <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0604379103>. Accessed March 2007
- Ipek, M., A. Ipek, S.G. Almquist, and P.W. Simon. 2005. Demonstration of linkage and development of the first low-density genetic map of garlic, based on AFLP markers. Theor. Appl. Genet. 110:228-236.
- Ipek, M., A. Ipek, and P. Simon. 2003. Comparison of AFLPs, RAPD markers, and isozymes for diversity assessment of garlic and detection of putative duplicates in germplasm collections. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 128:246-252.
- Ipek, M., A. Ipek, and P. Simon. 2006. Sequence homology of polymorphic AFLP markers in garlic (*Allium sativum* L.). Genome 49:1246-1235.
- Jenderek, M.M., and R.M. Hannan. 2004. Variation in reproductive characteristics and seed production in the USDA garlic germplasm collection. HortScience 39:485-488.
- Jones, H.A., and L.K. Mann. 1963. Onions and their Allies. 286 p. Leonard Hill Books, London, UK.
- Jones, R., and H. Rees. 1968. Nuclear DNA variation in *Allium*. Heredity 23:591-605.
- Kamenetsky, R., I. London Shafir, M. Baizerman, C. Kik, F. Khassanov, and H.D. Rabinowitch. 2004. Garlic (*Allium sativum* L.) and its wild relatives from Central Asia: Evaluation for fertility potential. Acta Hort. (ISHS) 637:83-91.
- Kirk, J.T., O.H. Rees, and G. Evans. 1970. Base composition of nuclear DNA within the genus *Allium*. Heredity 25:507-512.
- Koul, A.K., R.N. Gohil, and A. Langer. 1997. Prospects of breeding improved garlic in the light of its genetic and breeding systems. Euphytica 28:457-464.
- Lallemand, J., C.M. Messian, F. Briand, and T. Etoh. 1997. Delimitation of varietal groups in garlic (*Allium sativum* L.) by morphological, physiological and biochemical characters. Acta Hort. (ISHS) 433:123-132.
- López, A., C. Rigoni, V. Silvestri, and J. Burba. 1997. Genetic variability estimation and correlations in white clonal type garlic (*Allium sativum* L.) characters. Acta Hort. (ISHS) 433:279-283.
- Maaß, H.I., and M. Klaas. 1995. Intra-specific differentiation of garlic (*Allium sativum* L.) by isozyme and RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 91:89-97.
- Mantel, N.A. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res. 27:209-220.
- Matus, I., M.I. Gonzalez, and A. Del Pozo. 1998. Evaluation of phenotypic variation in a Chilean collection of garlic (*Allium sativum* L.) clones using multivariate analysis. Plant Gen. Res. Newsl. 117:31-37.
- McCollum, G.D. 1987. Onion and allies. In N.W. Simmonds (ed.) Evolution of crop plants. p. 186-190. Longman S. & T., London, England.



Ordoñez, A., L.E. Torres, M.G. Hidalgo, y J.O. Muñoz. 2002. Análisis citológico de una variante genética somática de ajo (*Allium sativum* L.) tipo rosado. *Agriscientia* 19:37-43.

Ovesna, J., L. Lucera, J. Kralova, L. Leisova, H. Stavelikova, and J. Velisek. 2007. Genetic diversity among garlic clones as revealed by AFLP, phenotypic descriptors and S-aminoacid level. *Vegetable Crop Res. Bull.* 66:105-116.

Pooler, M.R., and P.W. Simon. 1993a. Characterization and classification of isozyme and morphological variation in a diverse collection of garlic clones. *Euphytica* 68:121-130.

Pooler, M.R., and P.W. Simon. 1993b. Garlic flowering in response to clone, photoperiod, growth temperature, and cold storage. *HortScience* 28:1085-1086.

Ranjekar, P.K., D. Pallota, and J.G. Lafontaine. 1978. Analysis of plant genomes. V. Comparative study of molecular properties of DNAs of seven *Allium* species. *Biochem. Genet.* 16:967-970.

Rohlf, F.J. 2000. NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1. Manual. Applied Biostatistics, New York, USA.

Rosales-Longo, F.U., y L.G. Molina-Monterroso. 2007. Diversidad genética de poblaciones de ajo (*Allium sativum* L.) cultivadas en Guatemala, definida por marcadores de ADN. *Agronomía Mesoamericana* 18:85-92.

Simon, P.W. 1993. Breeding carrot, cucumber, onion and garlic for improved quality and nutritional value. *Hort. Bras.* 11:171-173.

Sneath, P.A., and R.R. Sokal: 1973. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. 573 p. Freeman, San Francisco, California, USA.

Volk, G.M., A.D. Henk, and C.M. Richards. 2004. Genetic diversity among U.S. garlic clones as detected using AFLP methods. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 129:559-569.

Wilkie, S., P.G. Isaac, and R.J. Slater. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theor. Appl. Genet.* 86:497-504.

Zeder, M.A., E. Emshwiller, B.D. Smith, and D.G. Bradley. 2006. Documenting domestication: the intersection of genetics and archeology. *Trends Genet.* 22:138-155.