Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

| Desenvolvimento de marcadores microssatélites e caracterização da | |
|--|---|
| diversidade genética molecular de acessos de alho (Allium sativum L. |) |

Camila Pinto da Cunha

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Camila Pinto da Cunha Engenheira Agrônoma e Licenciada em Ciências Agrárias

| res microssatélites e caracterização da de acessos de alho (<i>Allium sativum</i> L.) |
|--|
| Orientador: Prof. Dr. JOSÉ BALDIN PINHEIRO |
| Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestro Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento do Plantas |

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP

Cunha, Camila Pinto da

Desenvolvimento de marcadores microssatélites e caracterização da diversidade genética molecular de acessos de alho (*Allium sativum* L.) / Camila Pinto da Cunha. - Piracicaba, 2011.

91 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Alho 2. Diversidade genética 3. Germoplasma vegetal 4. Marcador molecular I. Título

> CDD 635.26 C972d

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial a Dr^a. Aluana Gonçalves de Abreu, Carlos Eduardo de Araújo Batista, Guilherme da Silva Pereira, Dr^a. Maria Imaculada Zucchi, Dr^a. Mariza Monteiro, Miklos Maximiliano Bajay e Dr^a. Regina Helena Geribello Priolli pelas valiosas dicas sobre os procedimentos laboratoriais e discussões de resultados. A Talita Moreira Val e Jaqueline Bueno de Campos pela colaboração e assistência técnica. Ao Dr. Francisco Vilela Resende pela concessão de acessos de alho da Embrapa Hortalicas. Ao Prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho por ceder gentilmente uma cepa de E. coli TOP10. Aos funcionários Domingos de Salvio Amaral, Márcio Araújo Silva e Claúdio Roberto Segatelli pela ajuda no plantio e manutenção do germoplasma. A todos os colegas e funcionários do Laboratório de Diversidade de Plantas e Melhoramento e do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, ESALQ/USP, pela amizade e companheirismo. Ao Prof. Dr. José Baldin Pinheiro, meu orientador, pelos ensinamentos, motivação e amizade. A Prof^a. Dr^a. Maria Imaculada Zucchi e ao Prof. Dr. Giancarlo Conde Xavier de Oliveira pelas disciplinas, Genética de Populações (NG262, UNICAMP) e Evolução (LGN5803, ESALQ), que mudaram minha forma de pensar genética. A minha querida família, em especial, meus pais, Gisela e Sidney, meu irmão, Tiago, e à Clarete. Ao Dr. José Alberto Caram de Souza Dias e Dr. Cyro Paulino da Costa por serem, para mim, exemplos de dedicação à pesquisa e ensino. Finalmente, agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, auxílio pesquisa 2008/02936-5 e bolsa de mestrado 2009/03577-1).

SUMÁRIO

| RESUMO | 7 |
|---|----|
| ABSTRACT | 9 |
| LISTA DE FIGURAS | 11 |
| LISTA DE TABELAS | 13 |
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 17 |
| 2.1 Importância da espécie. | 17 |
| 2.2 Sistema reprodutivo e ploidia | 19 |
| 2.3 Germoplasma e coleção nuclear | 21 |
| 2.4 Marcadores moleculares | 23 |
| 2.5 Microssatélites | 25 |
| 2.6 Uso de marcadores moleculares em alho | 27 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 29 |
| 3.1 Material vegetal | 29 |
| 3.2 Extração de DNA | 29 |
| 3.3 Biblioteca genômica enriquecida com microssatélites | 30 |
| 3.4 Células quimicamente competentes e transformação genética | 32 |
| 3.5 Sequenciamento de clones positivos. | 32 |
| 3.6 Identificação e análise de motivos microssatélites | 34 |
| 3.7 Desenho de iniciadores. | 34 |
| 3.8 Otimização das reações em cadeia da polimerase (PCR) | 35 |
| 3.9 Preparo do gel de poliacrilamida e eletroforese | 36 |

| 3.10 Diversidade genética | 37 |
|---|----|
| 3.11 Estruturação genética | 38 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 39 |
| 4.1 Extração de DNA | 39 |
| 4.2 Motivos microssatélites | 40 |
| 4.3 Iniciadores para locos microssatélites | 43 |
| 4.4 Genótipos multi locos idênticos (MLGs) | 46 |
| 4.5 Caracterização dos locos microssatélites | 48 |
| 4.6 Diversidade genética dos bancos de germoplasma | 49 |
| 4.7 Coleção nuclear | 54 |
| 4.8 Estruturação genética de bancos de germoplasma e MLGs | 54 |
| 5 CONCLUSÕES | 63 |
| REFERÊNCIAS | 65 |
| ANEXOS | 83 |

RESUMO

Desenvolvimento de marcadores microssatélites e caracterização da diversidade genética molecular de acessos de alho (*Allium sativum* L.)

O alho é uma hortaliça importante não só pelo atrativo culinário, como também pelo grande número de propriedades medicinais. A utilização efetiva de recursos genéticos, conservados em bancos de germoplasma, em programas de melhoramento depende de criteriosa caracterização, utilizando em combinação caracteres agromorfológicos e marcadores moleculares. Neste estudo, 16 novos locos microssatélites específicos para a espécie foram desenvolvidos, 10 polimórficos. Os bancos de germoplasma de alho, das instituições IAC, ESALQ e Embrapa, foram caracterizados utilizando 17 locos microssatélites polimórficos, sete deles disponíveis na literatura. A maioria dos locos foi considerada moderado a altamente informativo, com PIC médio de 0,545 e máximo de 0,851. Foram encontrados 90 alelos, com riqueza alélica média de 2,258 alelos por loco e índice de Shannon de 1,176. A coleção da Embrapa apresentou destaque, com maior número de alelos privados e genótipos multi locos (MLGs). Os 151 acessos avaliados foram representados por 65 MLGs. A estratégia M foi utilizada para definição de uma coleção nuclear, que foi constituída por 16 acessos, com cobertura de 100% dos alelos e mínima redundância. O G_{ST}' geral foi de 0,200 e para MLGs de 0,068, indicando alta diferenciação genética dentro dos bancos de germoplasma, e G_{IS} de -0,195, indicando excesso de heterozigotos, comum em espécies de propagação vegetativa como o alho. A estruturação genética dos MLGs resultou na distinção de dois subgrupos pelo método Bayesiano, consistente com os agrupamentos observados no dendrograma e PCA. Os grupos formados apresentaram coerência com a classificação de acessos de acordo com o ciclo fenológico, em nobres e seminobres. Os marcadores microssatélites desenvolvidos neste trabalho são ferramentas valiosas para estudos de diversidade genética, conservação de germoplasma, mapeamento genético e associativo e espera-se que sejam úteis em futuros programas de melhoramento da espécie.

Palavras-chave: Alho; Coleção nuclear; Estruturação genética; Germoplasma; Repetições de Sequência Simples; SSR

ABSTRACT

Development of microsatellite markers and characterization of molecular genetic diversity among garlic (*Allium sativum* L.) accessions

Garlic is an important crop not only for its culinary attractiveness, but also because of a huge number of medicinal properties. The genetic resources in germplasm require characterization by morphological traits and molecular markers to be effectively used in breeding programs. A novel set of 16 SSR loci specific to garlic were developed. Ten loci were polymorphic, moderate to highly informative, with an average PIC of 0.545 and maximum of 0.851. A total of 151 accessions of garlic from three Brazilian germplam, IAC, ESALQ, and Embrapa, were evaluated for genetic diversity using 10 novel polymorphic SSR loci and other 7 available in the literature. A total of 90 alleles were detected, the average allelic richness was 2.258 alleles per locus and the Shannon index 1.176. The Embrapa collection had the vast majority of private alleles and multi locus genotypes (MLGs). The whole collection was reduced to 65 MLGs. The M strategy were used to define a core collection, 16 accessions were selected with 100% coverage of alleles and minimum redundancy. Overall G_{ST}' was 0.200 and for MLGs, 0.068, indicating a high genetic differentiation within collections, and G_{IS} was -0.195, indicating an excess of heterozygosity, which was expected as garlic is vegetatively propagated. MLGs were structured in two subgroups by Bayesian approach, consistent with the clustering based on genetic distances and PCA. The groups were coherent with the classification of accessions according to phenology (noble and semi-noble). The new SSR loci are tools for future studies of genetic diversity, germplasm conservation, mapping, and associative genetics, and hopefully will shed light on garlic breeding programs.

Keywords: Core collection; Garlic; Genetic structure; Germplasm; Simple Sequence Repeats; SSR

LISTA DE FIGURAS

| Figura 1 – Extração de DNA de 80 acessos de alho (<i>Allium sativum</i> L.) do banco de germoplasma do IAC e da ESALQ pelo protocolo de Doyle e Doyle (1990) com modificações. Análise da qualidade e concentração de DNA pela comparação com padrões de 50 ng (λ1), 75 ng (λ2), 100 ng (λ3), 150 ng (λ4), 200 ng (λ5) e 300 ng (λ6) de DNA do fago λ, através de eletroforese em gel de agarose 0,8%, TBE 1X (120 V), corado com SYBR Safe (Invitrogen) | 39 |
|---|-----|
| Figura 2 – Perfis de eletroferogramas de regiões SSR isoladas de biblioteca genômica de alho (<i>Allium sativum</i> L.), (A) Asa52, (B) Asa43, (C) Asa36 e (D) Asa29 | 4] |
| Figura 3 – Percentagem de sequências SSR com motivos di, tri, tetra e pentanucleotídeo das classes perfeito, interrompido e composto encontradas em biblioteca genômica de alho (<i>Allium sativum</i> L.) | 42 |
| Figura 4 – Número de repetições de motivos SSR dinucleotídeos (AT ou TA)n, (GT ou TG ou CA ou AC)n e (CT ou TG ou AG ou GA)n encontrados em biblioteca genômica de alho (<i>Allium sativum</i> L.) | 42 |
| Figura 5 – Perfil de genotípico de 80 acessos de lho (<i>Allium sativum</i> L.) em gel de poliacrilamida 7%; (A) Asa24, (B) GB-ASM-040 e (C) Asa10, polimórficos, e (D) Asa23, monomórfico | 4.5 |
| Figura 6 – Distribuição das frequências alélicas dos 90 alelos encontrados em acessos de alho (<i>Allium sativum</i> L.) nos bancos de germoplasma do IAC (vermelho), ESALQ (verde), Embrapa (roxo) e global (azul), utilizando 17 locos SSR | 51 |
| Figura 7 – Histograma das frequências de 90 alelos encontrados em bancos de germoplasma de alho (<i>Allium sativum</i> L.) utilizando 17 locos SSR | 53 |
| Figura 8 – Dendrograma construído a partir da matriz de distância genética de Rogers (1972) modificada por Wright (1978), através do critério de agrupamento UPGMA, para 65 genótipos multi locos idênticos de alho (<i>Allium sativum</i> L.) identificados nos bancos de germoplasma do IAC, ESALQ e Embrapa. O coeficiente de correlação cofenética é 0,9060. As barras laterais são referentes aos agrupamentos obtidos pelo programa STRUCTURE para K igual a dois e três. Valores de bootstrap inferior a 50% não apresentados | 59 |
| Figura 9 – Gráfico com a identificação do K mais provável pelo método <i>ad hoc</i> ΔK (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005) para estruturação genética de 65 genótipos multi locos idênticos de alho (<i>Allium sativum</i> L.) pelo STRUCTURE | 60 |
| Figura 10 – Análise de componentes principais da matriz de distância genética de Rogers (1972) modificada por Wright (1978) de 65 genótipos multi locos idênticos de alho (<i>Allium sativum</i> L.) identificados nos bancos de germoplasma do IAC, ESALQ e Embrapa; pontos vermelhos e verdes são referentes aos grupos obtidos polo programa STRUCTURE para Viguel a 2 | |
| obtidos pelo programa STRUCTURE para K igual a 2 | 62 |

LISTA DE TABELAS

| Tabela 1 – Novos iniciadores SSR para alho (<i>Allium sativum</i> L.) | 44 |
|---|----|
| Tabela 2 – Iniciadores SSR para alho (<i>Allium sativum</i> L.) desenvolvidos por Ma et al. (2009) | 45 |
| Tabela 3 – Genótipos multi locos idênticos (MLGs) com mais de um acesso representante dos bancos de germoplasma de alho (<i>Allium sativum</i> L.) do IAC, ESALQ e Embrapa | 46 |
| Tabela 4 – Genótipos multi locos idênticos (MLGs) com mais de um acesso representante identificados na análise conjunta dos bancos de germoplasma de alho (<i>Allium sativum</i> L.) do IAC, ESALQ e Embrapa | 47 |
| Tabela 5 – Parâmetros de diversidade e polimorfismo utilizados para a descrição de locos SSR em alho (<i>Allium sativum</i> L.) | 49 |
| Tabela 6 – Índices de diversidade obtidos para bancos de germoplasma (BAG) de alho (Allium sativum L.) utilizando marcadores SSR | 50 |
| Tabela 7 – Teste exato para determinar aderência das segregações ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) de 17 locos SSR em bancos de germoplasma (BAG) de alho (Allium sativum L.) | 55 |
| Tabela 8 – Estruturação genética de acessos e genótipos multi locos idênticos (MLGs) de alho (<i>Allium sativum</i> L.) dos bancos de germoplasma do IAC, ESALQ e Embrapa através da estimativa das estatísticas G (Nei, 1973; 1987) e AMOVA | |
| 1110 11 | 56 |

1 INTRODUÇÃO

O alho (*Allium sativum* L.), família Alliaceae, é uma das mais antigas hortaliças usada pela humanidade na culinária, devido ao sabor e aroma, e como planta medicinal. Hoje, apresenta recorde em número de pesquisas nas áreas médica, farmacológica e nutricional e é um fitoterápico reconhecido e aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS). As propriedades medicinais são inúmeras, o consumo regular de alho reduz o risco de doenças cardíacas, hipertensão, diabetes, asma e câncer, para citar alguns exemplos. Por ser um excelente antifúngico, bactericida e inseticida, é uma forma eficaz e ecologicamente correta para uso na agricultura no controle biológico de pragas. No Brasil, apesar do elevado consumo, com aumento de 4% ao ano, a área plantada vem reduzindo e o país é, hoje, dependente de importações.

Devido à importância econômica do alho, muitos países, como Alemanha, Argentina, Austrália, Brasil, Chile, Coreia do Sul, EUA, Holanda, Itália, Japão, Reino Unido, Turquia, entre outros, possuem bancos de germoplasma, mas o uso eficiente dessas coleções requer criteriosa e completa caracterização, representando economia de tempo e recursos para indicação de acessos de interesse em programas de melhoramento. Apesar de distinções relativamente simples entre cultivares de alho ser realizada frequentemente através de caracteres agromorfológicos e fisiológicos, a alta influência ambiental e os diferentes critérios em nível nacional e internacional inviabilizam estudos comparativos.

Assim, os marcadores moleculares são os mais indicados para estudos de diversidade genética, mapeamento genético e associativo, seleção assistida e filogenia, principalmente por possuírem segregação mendeliana e não sofrerem influência ambiental. Níveis significativos de variabilidade genética em alho foram detectados utilizando marcadores RAPD, AFLP, SNP e, recentemente, microssatélites (SSR). Apesar da grande diversidade de marcadores, os SSR apresentam destaque, pela ampla distribuição e alta frequência nos genomas de eucariotos, com excelente detecção de polimorfismo, reprodutibilidade entre laboratórios e relativo baixo custo.

Marcadores SSR específicos para a espécie foram desenvolvidos somente recentemente por Ma et al. (2009) e utilizados para caracterização de um banco de germoplasma por Zhao et al. (2011). O pequeno número de locos SSR disponíveis, quando comparado a outras espécies, se deve provavelmente a complexidade do genoma, que apesar de diplóide é um dos maiores

entre as plantas cultivadas, com excesso de duplicações intracromossomais, além de variações no cariótipo, irregularidades na meiose e autopoliploidia.

O Brasil possui clones com denominações regionais ou populares, que podem levar a caracterizações duvidosas do material, por isso, o estudo da diversidade genética é passo primordial para conservação de acessos de alho em bancos de germoplasma. O presente trabalho tem por objetivo o desenvolvimento e otimização de locos SSR específicos para alho e utilização dos novos locos e daqueles disponíveis na literatura para a caracterização da diversidade genética dos bancos de germoplasma do Departamento de Genética (ESALQ/USP), Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e da Embrapa Hortaliças (Embrapa). Entre os objetivos específicos destacam-se, a construção de biblioteca genômica enriquecida com sequências SSR e desenvolvimento de marcas informativas, análise da diversidade e estruturação genética dos acessos dentro e entre as coleções brasileiras analisadas, identificação de genótipos multi locos idênticos e determinação de coleções nucleares para cada uma das instituições de pesquisa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância da espécie

O alho (*Allium sativum* L.) é uma das mais antigas hortaliças cultivada no mundo, usada na culinária e como planta medicinal desde o período Neolítico (5.000 a.C.) pelas primeiras civilizações na Índia, China, Egito, Grécia e Roma (BREWSTER, 2008; ERNST, 2007; ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES DE ALHO - ANAPA, 2009). Hoje o alho é um fitoterápico aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS), recorde em número de pesquisas na área médica, farmacológica e nutricional.

A espécie pertence à família Alliaceae e ordem Asparagales, segunda em importância econômica entre as monocotiledôneas ficando atrás apenas dos cereais. O centro de origem apesar de controverso é considerado na Ásia Central, onde parentes selvagens do atual alho comercial foram encontrados (SIMON; JENDEREK, 2003; ETOH; SIMON, 2002; BREWSTER, 2008). Segundo Lisbão et al. (1993), o segundo centro de origem da espécie é a região do Mediterrâneo, se espalhando, em seguida, para China e Europa Ocidental e levado para a América por colonizadores espanhóis, portugueses e ingleses. Vários foram os eventos de domesticação da espécie, o que explica a elevada diversidade genética e adaptações a diferentes condições edafoclimáticas (LISBÃO et al., 1993).

O alho é uma planta herbácea com folhas lanceoladas, cujas bainhas formam o pseudocaule; as gemas foliares subterrâneas, em condições adequadas, se desenvolverão em bulbilhos, que envolvidos pelas brácteas formam o bulbo (TRANI et al., 1997). Os bulbos e as folhas são usados na alimentação, devido ao sabor e aroma, *in natura*, cozido, frito ou desidratado. Substâncias benéficas a saúde como oligossacarídeos, glicosídeos esteroidais, flavonóides, antocianinas, lecitinas, óleos essenciais, pectinas, frutanos, prostaglandinas, vitaminas B₁, B₂, B₆, C e E, biotina, niacina, aminoácidos essenciais, adenosina, compostos fenólicos e selênio estão presentes no alho, mas é o alto conteúdo de compostos voláteis de enxofre, em grande parte na forma de alicina, o responsável por suas propriedades medicinais (ARZANLOU; BOHLOOLI, 2010; BANERJEE; MUKHERJEE; MAULIK, 2003; BOZIN et al., 2008; QUEIROZ et al., 2009).

Alguns estudos sugerem que seu uso, como suplemento na dieta, aumente a imunidade sistêmica e atue contra problemas cardíacos, hipertensão, diabetes e asma, além de prevenir alguns tipos de câncer, como de estômago e colo (ABOUL-ENEIN; ABOUL-ENEIN, 2005; AGARWAL, 1996; ALI; THOMSON; AFZAL, 2000; ARIGA; SEKI, 2006). Na área de nutrição de ruminantes, estudos indicam que o uso de extratos alcoólicos de alho na ração pode substituir o uso de ionóforos, auxiliando a fermentação e reduzindo a produção de gás metano (GARCÍA-GONZÁLEZ et al., 2008; PATRA; KAMRA; AGARWAL, 2006).

Além do uso farmacológico e nutricional para humanos e animais, na agricultura, o alho apresenta elevado potencial no controle biológico de pragas (BANDYOPADHYAY; ROY; DAS, 2001; CHIAM et al., 1999; CURTIS et al., 2004; FLINT et al., 1995; GURUSUBRAMANIAN; KRISHNA, 1996; JARIAL, 1996; LATHA et al., 2009; MACHIAL et al., 2010; PROWSE; GALLOWAY; FOGGO, 2006; REDDY; REDDY; MURALIDHARAN, 2009; XIA; NG, 2005). Inseticidas comerciais a base de alho já estão disponíveis no mercado, como Garlic Barrier AG (Glendale, CA) e ENVIRepel (Cal Crop USA, Greeley, CO).

O alho é também um reservatório de genes com potencial biotecnológico, como o gene ASAL (*Allium sativum leaf agglutinin*) e ASAII (*Allium sativum bulb lectin II*) usados, respectivamente, na produção de plantas transgênicas de arroz resistente a cigarrinhas e algodão resistente a larvas da ordem Lepidoptera, além da proteína ASS8P20, com atividade celulósica de interesse industrial (KIM et al., 2010; SADEGHI et al., 2008; SAHA; DASGUPTA; DAS, 2006; SENGUPTA et al., 2010).

Em termos econômicos, o consumo de alho no Brasil vem crescendo desde 1961, passando de 0,5 Kg per capita para 1,2 Kg per capita em 2005 (LUCINI, 2008). Na década de 80, a produção brasileira supria 90% da demanda interna, hoje o país é dependente de importações. China e Argentina juntas suprem 70% da demanda e apenas 30% do alho consumido internamente é produzido nas regiões Sul e Centro-Oeste do Brasil, com destaque para o Cerrado, com produtividade de 15 a 20 toneladas por hectare por ano (LUCINI, 2010).

O grande entrave na produção brasileira se deve a falta de legislação e fiscalização na produção de alho-semente, pois, em geral, são os próprios produtores que escolhem os melhores bulbos para serem plantados na safra seguinte, com isso viroses, nematóides, fungos e bactérias se mantém na cultura levando a produções cada vez menores (ANAPA, 2009). A

importação de alho da China é outro ponto importante, pois os preços baixos reduzem a competitividade dos produtores nacionais (ANAPA, 2009). Além disso, há o risco de contaminação da cultura com pragas quarentenárias, sério problema para a produtividade de hortaliças e para a saúde humana (ANAPA, 2009).

Apesar do uso na medicina, nutrição e agricultura comprovado cientificamente e da importância econômica, o alho é tema de poucos estudos básicos em genética, principalmente aqueles que auxiliariam sobremaneira programas de melhoramento genético da espécie, como compreensão da infertilidade masculina, florescimento, citogenética e hibridização, para citar alguns exemplos. Sendo assim, utilização de acessos em bancos de germoplasma é baixa e os programas de melhoramento genético da espécie ficam comprometidos, com poucos avanços observados. Países como Alemanha, Argentina, Austrália, Brasil, Chile, Coreia do Sul, EUA, Holanda, Itália, Japão, Reino Unido e Turquia vêm colecionando acessos de alho. No entanto, o uso eficiente dessas coleções dependerá não somente de caracterização e avaliação criteriosa, mas também de uma melhor compreensão sobre a espécie (MATUS; GONZÁLEZ; POZO, 1999; STRAUSS; PINO; COHEN, 1988).

2.2 Sistema reprodutivo e ploidia

O alho comercial é estéril e sua reprodução realizada exclusivamente por propagação vegetativa, com presença de apomixia. Apesar de possuir todos os genes para florescimento, condições fisiológicas e morfológicas levam ao bloqueio reprodutivo, pela não produção da haste floral, aborto da inflorescência em estádios iniciais de diferenciação ou pela substituição da flor por bulbilhos aéreos (ROTEM et al., 2007). A falta de recombinação meiótica limita a variabilidade genética presente na espécie, resultando em uma enorme quantidade de clones, mas a grande desvantagem da propagação vegetativa para a agricultura reside na elevada transmissão de doenças e presença de pragas, que reduzem a produtividade e a qualidade do produto final e aumentam os custos com armazenamento de material para plantio (SIMON; JENDEREK, 2003).

A Ásia Central abrange países como Afeganistão, Turquia, Irã e Rússia, e é nesta região que a maior variabilidade do gênero *Allium* é encontrada, são mais de 600 espécies catalogadas, incluindo ecótipos do atual alho comercial, com sistemas reprodutivos distintos

(SIQUEIRA; TAVARES; TRANI, 1996). A espécie selvagem *A. longicuspis*, que floresce e produz sementes férteis, é similar ao alho em relação à morfologia, cariótipo e perfil de isoenzimas, RAPD e AFLP, chegando a ser considerada por alguns autores como a mesma espécie (ETOH; SIMON, 2002; IPEK; IPEK; SIMON, 2003; SIMON; JENDEREK, 2003). O cruzamento entre alho e *A. longicuspis* produz híbridos férteis e viáveis, o que corrobora para a hipótese de esta última ser a espécie ancestral ou o parente mais próximo do atual alho comercial (BOZZINI, 1991; ETOH; SIMON, 2002).

Devido a essas descobertas, é provável que o ancestral comum das espécies do gênero *Allium* apresentasse reprodução sexual (SIMON; JENDEREK, 2003). Mudanças no modo de reprodução são, em geral, correlacionadas a condições ambientais adversas e o habitat natural do alho ancestral, vales rochosos com clima semi-árido a árido, deve ter favorecido a reprodução via bulbilhos (SIMON; JENDEREK, 2003; BEATTY et al., 2008). A dormência dos bulbilhos poderia ser vantajosa em períodos seco e frio, o que garantiria a sobrevivência em condições sub-ótimas. Com a falta de recombinação gamética, o desequilíbrio de ligação entre fatores genéticos de alto grau adaptativo se perpetuaria, evitando custos adicionais relacionados ao sexo (FUTUYMA, 2006). Apesar de a propagação vegetativa levar uma espécie a um "beco sem saída" evolutivo, a intervenção humana pode ter favorecido este estado e através da seleção de clones, novas variedades foram sendo obtidas (BOZZINI, 1991).

Estas hipóteses foram confirmadas por Etoh e Simon (2002) com a descoberta de acessos de alho férteis na Ásia Central, constatando que após polinização, 12% das sementes produzidas germinaram. Esta descoberta permitirá a realização de melhoramento genético clássico, usando sementes e seleção de caracteres de interesse. No entanto, o êxito da cultura ainda é bastante dependente da variabilidade genética existente em bancos de germoplasma, pois novas cultivares são obtidas via seleção de mutações naturais ou induzidas em caracteres de interesse (BURBA, 1993; VOLK; HENK; RICHARDS, 2004). Apesar disso, o alho cultivado exibe ampla variação morfológica e adaptação às mais diversas regiões, com diferentes respostas a temperatura e fotoperíodo, em relação ao crescimento, morfologia, maturação, florescimento ou bulbificação, indicativos de plasticidade fenotípica (POOLER; SIMON, 1993; SIMON; JENDEREK, 2003; SIQUEIRA; TAVARES; TRANI, 1996).

O alho comercial é diplóide, com número de cromossomos 2n = 2x = 16, mas há relatos de variedades com 2n = 2x = 12 e 2n = 2x = 18 (YÜZBASIOGLU; ÜNAL, 2004). Alhos tetraplóides (2n = 4x = 32) foram encontrados na Itália apresentando florescimento e produção de sementes férteis (BOZZINI, 1991). A provável autopoliploidia amplia ainda mais as possibilidades de melhoramento genético e evidencia a complexidade do genoma da espécie, pois variações no cariótipo de alho foram também encontrados em relação à localização de centrômeros, tamanho dos cromossomos e número de cromossomos satélites por Hong et al. (2000). Além disso, irregularidades na meiose, presença de multivalentes e deleções, duplicações e translocações cromossomais, encontradas no alho e comuns em outras espécies de propagação assexual, podem estar relacionadas à esterilidade de seus gametas (ETOH; OGURA, 1977; ETOH; SIMON, 2002).

2.3 Germoplasma e coleção nuclear

Os bancos de germoplasma são definidos como unidades de conservação e manutenção de recursos genéticos vegetais, que contenham um único exemplar de cada material genético (genótipo), seja indivíduo vivo, semente, pólen ou antera (ALLARD, 1971). As coleções possuem uma ampla gama de variedades e cultivares, incluindo aquelas em desuso, as tradicionais e modernas, além de parentes selvagens, que constituem a base genética da espécie. As cultivares apresentam elevada uniformidade e base genética estreita e, por isso, a busca por características de interesse relacionadas à resistência a estresses bióticos ou abióticos ou aspectos morfológicos, deve ser feita primeiramente em bancos de germoplasma da espécie (SINGH; LEBEDA, 2007).

As informações obtidas pela caracterização de acessos em bancos de germoplasma devem estar organizadas em um banco de dados para auxiliar os geneticistas na escolha de acessos de interesse. A caracterização morfológica e molecular das coleções garante economia de tempo e de recursos financeiros, além de permitir a identificação de acessos com mesmo genótipo ou a necessidade de se coletar mais acessos ou incluir novos acessos provenientes de outros bancos de germoplasma, com o objetivo de maximizar a variabilidade genética presente. Outro ponto importante é realizar cada etapa do processo de manutenção de forma rigorosa, da separação

de material para multiplicação, plantio, tratos culturais, colheita até o armazenamento, evitando que materiais geneticamente distintos se percam ou que haja misturas de materiais.

A identificação de uma coleção nuclear, ou seja, de um subconjunto de acessos, que represente a diversidade de toda a coleção sem redundância ou que apresente determinadas características de interesse, é também de grande auxílio para a tomada de decisão feita por geneticistas em seus programas de melhoramento genético (HAMON et al., 1995). Existem inúmeras estratégias descritas para definição de uma coleção nuclear.

Quando os acessos estão agrupados pela origem e não há informações sobre caracteres agromorfológicos ou moleculares, as estratégias C, P e L podem ser usadas, com as coleções nucleares sendo definidas, respectivamente, de forma uniforme entre grupos, como uma proporção relativa ao tamanho dos grupos e como uma proporção do logaritmo do tamanho de cada um dos grupos (GOUESNARD et al., 2001).

Na presença de dados moleculares, as estratégias H e M são mais eficazes. A estratégia H maximiza o número de alelos na coleção nuclear através da amostragem de acessos em cada um dos grupos, de forma proporcional a diversidade genética dentro deles (GOUESNARD et al., 2001). A estratégia M, apesar de ser derivada da H é mais robusta, pois se utiliza de simulações de Monte Carlo; assim, a partir de todas as possíveis coleções, aquela com maior riqueza alélica ou presença de desequilíbrio de ligação entre marcas será a candidata final (GOUESNARD et al., 2001).

O alho cultivado no Brasil vem do Egito, México e países da América Latina, entre eles, Argentina e Peru (LISBÃO et al., 1993). A variabilidade da espécie no país está assegurada em acessos presentes em quatro bancos de germoplasma: Embrapa Hortaliças, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri/CEPA), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP) e Instituto Agronômico de Campinas (IAC). Estes bancos foram caracterizados parcialmente por caracteres agromorfológicos e isoenzimáticos e recentemente com o uso de marcadores moleculares RAPD e AFLP, que acrescentaram informações relevantes quanto à representatividade destas coleções e a relação entre acessos.

De acordo com Siqueira, Tavares e Trani (1996), as variedades de alho são classificadas de acordo com o ciclo fenológico em (*i*) precoces, pouco sensíveis ao fotoperíodo, com bulbificação em 4 a 4,5 meses, os exemplo são Branco Mineiro, Cajuru, Canela de Ema,

Mossoró, Gravatá e Cará; (ii) intermediários, com ciclo fenológico médio entre 4,5 e 5,5 meses, os exemplos são Lavínia, Amarante, Peruano, Cateto Roxo, Areal, Assaí, Chinês, Gigante, Gigante de Curitibanos, São José, Mendonça e Roxinho; e (iii) tardios, altamente dependentes de fotoperíodo e clima frio, com ciclos longos para bulbificação (mais de 5,5 meses), os exemplo são Centenário, Barbado, Chonan, Jonas, Roxo Pérola de Caçador e Quitéria.

Os grupos de variedades precoces e intermediárias são também conhecidos como alho seminobre, pois não necessitam de tecnologia para plantio, apresentam baixa produtividade com aproximadamente quatro toneladas por hectare e mais de 20 bulbilhos por bulbo (SIQUEIRA; TAVARES; TRANI, 1996). Enquanto, os tardios são, em geral, material importado, que precisa de vernalização ou frigorificação antes do plantio, apresentando elevada produtividade, com até 15 toneladas por hectare, e bulbos grandes e, por isso, são conhecidos como vernalizados ou nobres (SIQUEIRA; TAVARES; TRANI, 1996).

2.4 Marcadores moleculares

Distinções entre cultivares de alho em bancos de germoplasma são usualmente realizadas por descritores morfológicos e isoenzimáticos (SIQUEIRA et al., 1985; MAAß; KLAAS, 1995; BAGHALIAN et al., 2005; MOTA et al., 2005; TRANI et al., 2005; PANTHEE et al., 2006; HOOGERHEIDE, 2009; OLIVEIRA et al., 2010). Os caracteres agromorfológicos da parte aérea (altura da planta, ângulo de inserção e comprimento de folhas e brotação prematura), bulbos (tamanho dos bulbos e bulbilhos, coloração da túnica do bulbo e película do bulbilho), florescimento (altura da haste floral, número e tamanho de bulbilhos na haste floral e umbela), rendimento, produtividade, ciclo fenológico e resistência a pragas e doenças e ao armazenamento, por exemplo, possibilitam a identificação de diferentes variedades (SIQUEIRA; TAVARES; TRANI, 1996; LISBÃO et al., 1993).

No entanto, a classificação de coleções baseada somente na diversidade fenotípica é considerada ambígua e incompleta, pois apresenta diferentes critérios em nível nacional e internacional, criando situações confusas quando se pretende realizar uma análise comparativa, além de ser altamente influenciada pelo ambiente. Deste modo, existe uma grande probabilidade de se encontrar em bancos de germoplasma, acessos com diferentes

nomes, que apresentam o mesmo genótipo, ou acessos idênticos com diferentes denominações (SIQUEIRA; TAVARES; TRANI, 1996). O Brasil possui uma enorme quantidade de clones com denominações regionais ou populares, que resultam em caracterizações duvidosas de acessos, levando alhicultores a adquirir material para plantio de baixa produtividade ou conservação pós-colheita.

O avanço da biologia molecular com o desenvolvimento de técnicas baseadas em enzimas de restrição, PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e sequenciamento de DNA, levaram ao desenvolvimento dos marcadores moleculares, que são definidos como qualquer sequência de DNA que revele polimorfismo entre indivíduos. Atualmente, são esses marcadores os mais indicados para estudos de mapeamento genético, seleção assistida, diversidade genética, filogenia e taxonomia e são preferidos em relação aos fenotípicos por apresentarem segregação mendeliana e ausência de influências ambientais.

Os principais marcadores moleculares são: (i) codominantes: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, BOTSTEIN et al., 1980), SSR (Simple Sequence Repeat, TAUTZ, 1989) e SNP (Single Nucleotide Polymorphism, CHO et al., 1999) e (ii) dominantes: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, WILLIAMS et al., 1990) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, VOS et al., 1995).

Apesar da grande diversidade de marcadores moleculares, os SSR apresentam destaque em relação aos demais, por serem altamente polimórficos e por possuírem ampla distribuição e frequência nos genomas de eucariotos, com alta reprodutibilidade entre laboratórios (SCHLÖTTERER, 2004). Um loco típico SSR pode apresentar mais de 10 alelos e elevada heterozigosidade em amostras pequenas, características de grande interesse em estudos de genética de populações (BOWCOCK et al., 1994, DEKA et al., 1995; PRIMMER et al., 1996). Por isso, os SSR vêm superando o uso de RFLP e RAPD (JARNE; LAGODA, 1996). A grande vantagem dos SSR é o uso de iniciadores específicos para amplificação de regiões genômicas bem definidas, cujo número de repetições do motivo SSR será o responsável pela variabilidade observada. A desvantagem da técnica está no tempo para identificação e caracterização de locos e a dificuldade em determinar precisamente o tamanho de fragmentos (GOLDSTEIN; POLLOCK, 1997).

2.5 Microssatélites

Microssatélites, SSR (Simple Sequence Repeats) ou STR (Short Tandem Repeats) são sinônimos de sequências genômicas compostas por motivos de um a seis nucleotídeos repetidos em tandem, encontrados em alta frequência no genoma e localizados tanto em regiões codantes e não codantes, como em *clusters* na heterocromatina (SCHWARZACHER, 2003; WEBER; MAY, 1989). Os SSRs podem ser neutros ou ter uma função definida no genoma, como regular a expressão de genes, conferir patogenicidade em microrganismos, sinalizar *hot spots* de recombinação e servir como um reservatório de variabilidade genética (OLIVEIRA et al., 2006).

Os SSRs no genoma parecem não ocorrer aleatoriamente, especula-se que estas sequências surgem espontaneamente via proto-SSR (*de novo* SSR), através de eventos de indel ou pela inserção de formas primárias de SSR via transposons em regiões receptivas do genoma (BUSCHIAZZO; GEMMELL, 2006). Quando duplicações em tandem são geradas, o deslize durante a replicação, a recombinação intercromossomal desigual ou a mutação de ponto podem amplificar ou restringir o comprimento dessas sequências (BUSCHIAZZO; GEMMELL, 2006).

O processo de mutação de um dado loco SSR encontra restrições, que limitam o tamanho dos alelos. Em geral, alelos longos têm maior chance de se tornarem menores a cada mutação e raramente excederão 50 repetições (CALABRESE; DURRETT; AQUADRO, 2001). Com os limites impostos ao tamanho dos SSR, um restrito número de estados alélicos pode ser encontrado, elevando a probabilidade de homoplasia. Apesar das sequências SSR apresentarem um equilíbrio entre as etapas de expansão e contração do número de repetições, interrupções ocasionais podem levar a degeneração dessas sequências, mas é provável que a taxa de surgimento de novas sequências seja muito superior a extinção, o que explicaria a riqueza e a ampla distribuição delas nos genomas (BUSCHIAZZO; GEMMELL, 2006).

O polimorfismo detectado em locos SSR é elevado. Em eucariotos, a taxa de mutação é estimada entre 10⁻⁷ e 10⁻³ mutações por loco por geração e a variação genética encontrada é, em geral, caracterizada por elevada heterozigosidade e múltiplos alelos (ELLEGREN, 2004). Em plantas, a frequência de SSR é inversamente proporcional ao tamanho do genoma e varia

entre táxons, sendo localizados principalmente em regiões codantes não traduzidas (MORGANTE; HANAFEY; POWELL, 2002).

A complexa dinâmica mutacional imposta aos SSR é influenciada por um grande número de variáveis, entre elas: (*i*) características da sequência (número de repetições, composição de nucleotídeos e tipo do motivo), (*ii*) contexto genômico (taxa de mutação, composição das sequências flaqueadoras e posição no cromossomo), (*iii*) contexto biológico do indivíduo (sexo, idade, ambiente e mecanismo de reparo do DNA), (*iv*) influências seletivas (taxa metabólica, sistema reprodutivo e tempo de geração) e (*v*) mecanismos de mutação (intercâmbio intercromossomais, deslize durante a replicação e interrupções) (BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002; BUSCHIAZZO; GEMMELL, 2006).

O excesso de polimorfismo e a elevada taxa de mutação fazem dos marcadores SSR uma excelente ferramenta para estudos de genética de populações. A definição de um modelo mutacional teórico para SSR é obrigatório para estimar os inúmeros parâmetros em genética de populações a partir da heterozigosidade observada (OLIVEIRA et al., 2006). Nenhum dos modelos teóricos existentes inclui todas as variáveis que influenciam na dinâmica mutacional dessas sequências, no entanto, um modelo deverá ser escolhido *a priori*.

Os modelos de mutação amplamente difundidos são o *Infinite Alleles Model* (IAM; KIMURA; CROW 1964; LEWONTIN; HUBBY, 1966; TAJIMA, 1996) e o *Stepwise Mutation Model* (SMM; KIMURA; OHTA, 1978). Muitos outros modelos estão descritos na literatura, grande parte deles derivada ou baseada no IAM e SMM.

No modelo IAM, cada nova mutação, gera um novo alelo, a uma taxa conhecida, μ , assim, alelos idênticos o serão por descendência (BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002). No entanto, alelos SSR com motivos e número de repetições idênticos podem sê-lo por homoplasia e não por descendência, pois sofreram passos mutacionais distintos. Esse modelo só é útil se considerarmos que alelos idênticos são em estado (estrutura) e não devido à ancestralidade comum (ELLEGREN, 2004). As estatísticas F de Wright (1931) estão em conformidade com esse modelo mutacional (OLIVEIRA et al., 2006).

Outra opção é o modelo SMM, que pressupõe a cada nova mutação a geração de um novo alelo pela adição ou deleção de uma unidade de repetição SSR, com probabilidade igual à $\mu/2$ nas duas direções. Assim, alelos com tamanhos diferentes serão mais divergentes daqueles com tamanhos similares (BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002). A restrição do modelo

SMM é que este não leva em conta as restrições observadas no tamanho dos alelos, nem a presença de homoplasia (ELLEGREN, 2004; OLIVEIRA et al., 2006). As estatísticas de Slatkin (1995) e as de Nei (1973) utilizam alternativas do modelo SMM para estimação de parâmetros populacionais.

Apesar dos modelos mutacionais específicos para SSR não refletirem todas as inúmeras variáveis que afetam o ciclo de vida dessas sequências, sua utilização permite que estimativas confiáveis sobre a história evolutiva de populações naturais ou a relação entre acessos em bancos de germoplasma sejam obtidas, vide o grande número de estudos disponíveis na literatura.

2.6 Uso de marcadores moleculares em alho

Níveis significativos de variabilidade genética também foram observados em clones de alho, presentes em bancos de germoplasma, usando marcadores moleculares dos tipos RAPD (MAAß; KLAAS, 1995; BRADLEY; RIEGER; COLLINS, 1996; AL-ZAHIM; NEWBURY; FORD-LLOYD, 1997; MOTA et al., 2004, 2006; BAGHALIAN et al., 2005; BRANDOLINI et al., 2005; FIGLIUOLO; DI STEFANO, 2007; VIEIRA; NODARI, 2007; BUSO et al., 2008; IPEK; IPEK; SIMON, 2008b), AFLP (GARCÍA LAMPASONA; MARTÍNEZ; BURBA, 2003; IPEK; IPEK; SIMON, 2008a; MORALES et al., 2010; VOLK; HENK; RICHARDS, 2004) e mais recentemente SSR, com o desenvolvimento de oito marcas polimórficas (MA et al., 2009; ZHAO et al., 2011).

Avanços na compreensão da genética da espécie começaram com os estudos de diversidade genética, mas com a descoberta de acessos férteis estudos de grande interesse para o melhoramento se tornaram possíveis, como o mapeamento genético. Novas ferramentas, como o banco de dados de sequências expressas de alho (EST; *Expressed Sequence Tags*) GarlicESTdb, com 21.595 sequências catalogadas, e a biblioteca BAC (*Bacterial Artificial Chromossome*) são valiosas para compreensão da genética da espécie a nível celular e molecular, ainda pouco investigada (KIM et al., 2009; LEE et al., 2003). Técnicas de transformação genética via *Agrobacterium* e bombardeamento já estão disponíveis na literatura, ampliando ainda mais as possibilidades de estudos genéticos com a obtenção de

transgênicos, de interesse acadêmico ou até comercial (KENEL; EADY; BRINCH, 2010; SAWAHEL, 2002; ZHENG et al., 2004).

A espécie conta com um mapa de ligação baseado em marcas de EST-SNPs para compreensão da fertilidade masculina observada em clones férteis e um mapa genético de baixa densidade baseado em marcas de AFLP para enzimas relacionadas às propriedades medicinais da planta (IPEK et al., 2005; ZEWDIE et al., 2005). O alto número de marcas com segregação com a proporção 15:1 são evidências do alto índice de heterozigosidade e duplicação (IPEK et al., 2005). Aliado a este fato está o tamanho do genoma do alho com 15.900 Mbp DNA por núcleo 1C, um dos maiores entre as plantas cultivadas, seis a 16 vezes superior ao de arroz, indícios da complexidade do genoma da espécie (OHRI; FRITSCH; HANELT, 1998; HAVEY et al., 2008).

Os mapas genéticos são um grande avanço para a espécie, mas necessitam de maior número de marcas polimórficas para uma ampla e efetiva cobertura dos cromossomos e obtenção de maior confiabilidade na correlação de locos e características agronômicas. Entre os marcadores moleculares, os SSR são os mais indicados para uma ampla gama de estudos em genética, principalmente, por serem altamente informativos e abundantes nos genomas. Apesar de oito marcas SSR, específicas para alho, já estarem disponíveis na literatura, somente com a disponibilidade de maior número de marcas é que estudos genéticos mais complexos poderão ser realizados.

As possibilidades de melhoramento da espécie são, hoje, enormes, de melhoramento clássico, mutagênese, manipulação da ploidia até transgenia, deixando para trás a idéia restritiva de seleção de mutações naturais. No entanto, o estudo da diversidade genética em bancos de germoplasma é passo primordial não só para conservação, manutenção e classificação das coleções, mas também para a identificação de acessos de interesse para futuros programas de melhoramento genético.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

No total foram avaliados 151 acessos de alho pertencentes a bancos de germoplasma (BAGs) brasileiros: Instituto Agronômico de Campinas (IAC, Campinas/São Paulo) e Departamento de Genética, ESALQ/USP (Piracicaba/São Paulo), com 63 e 17 acessos (Anexo A), respectivamente, e 71 acessos da Embrapa Hortaliças (Brasília, Distrito Federal) (Anexo B). Os acessos da Embrapa Hortaliças foram selecionados de forma a incluir acessos de diferentes origens, buscando manter a representatividade da coleção como um todo. Os acessos do IAC e ESALQ foram plantados em campo experimental na ESALQ/US. Os acessos nobres da Embrapa foram vernalizados (câmera fria a 10°C) por 20 dias, quando iniciaram a brotação e, em seguida, plantados em vasos na estufa. Folhas jovens foram embaladas e transportadas para o laboratório em nitrogênio líquido e liofilizadas por 72 horas a –50°C e 0,04 mbar (Freeze Dryer ALPHA 1-2LD Plus, Christ). O material vegetal seco foi triturado em moinho de facas e armazenado em frascos plásticos devidamente identificados em temperatura ambiente.

3.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com Doyle e Doyle (1990) com modificações. Em tubo, 800 μL de tampão de extração pré-aquecido (CTAB 2%, 1,42 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, PVP 2% e β-mercaptoetanol 0,6%) foram adicionados a 25 mg do material vegetal e mantidos em banho-maria à 65°C por 40 min. Após a adição de 450 μL de fenol e centrifugação a 10.000 rpm por 10 min, a fase intermediária formada (aquosa e translúcida) foi transferida para novo tubo. As etapas de transferência do sobrenadante para novo tubo e centrifugação foram repetidas após a adição de 450 μL de 1:1 fenol:CIA (CIA, 24:1 clorofórmio:álcool isoamílico) e 450 μL de CIA. A precipitação do DNA foi realizada com 600 μL de isopropanol gelado e 100 μL de 7,5 M de acetato de amônio, com incubação a –20°C por 1h. O precipitado foi lavado, em duas etapas consecutivas, com etanol 70% e etanol absoluto com centrifugação a 10.000 rpm por 5 min. O precipitado foi seco em temperatura

ambiente e ressuspendido em 100 μ L de TE (10 mM Tris e 1 mM EDTA, pH 8,0). Em seguida, cada amostra de DNA foi tratada com 1 μ L de RNase (10 mg mL-1, Ribonuclease A, Sigma) a 37°C por 1 h e armazenados à –20°C, devidamente identificados.

A qualidade e concentração do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, TBE 1X (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico e 2 mM EDTA), a 120 V, corado com SYBR Safe (Invitrogen) e visualizado sob UV (Major Science Compact Digimage System). A quantificação do DNA foi realizada pela comparação das bandas das amostras com bandas de DNA do fago λ, com concentrações variando entre 50 e 300 ng.

3.3 Biblioteca genômica enriquecida com microssatélites

A construção da biblioteca genômica enriquecida com sequências SSR foi realizada com DNA genômico de um dos acessos do BAG da ESALQ/USP escolhido aleatoriamente, de acordo com protocolo de Billotte et al. (1999) com modificações descritas por Dutech et al. (2000). Aproximadamente 5 μg de DNA foram digeridos com 50 U da enzima de restrição *RsaI* (Invitrogen), em reação contendo tampão 1X e 4 mM de espermidina, em volume final de 100 μL, por 3 h a 37°C.

Com o objetivo de aumentar o número de cópias dos fragmentos genômicos, os adaptadores *Rsa*21 e *Rsa*25 (Integrated DNA Technologies, Inc.) foram ligados as extremidades 5' e 3', respectivamente, dos fragmentos obtidos. A reação de ligação dos adaptadores foi realizada com tampão 1X (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 2 mM MgCl₂; 2 mM DTT; 5 μg ml-1 de BSA), 4 μM de *Rsa*21, 4 μM de *Rsa*25, 4 U de T₄ DNA ligase (Invitrogen) e 6 μL de DNA digerido, em volume final de 50 μL, por 2 h a 20°C. Em seguida, a reação da Polimerase em Cadeia (PCR) foi realizada, usando o adaptador *Rsa*21 como iniciador.

Os componentes da PCR foram: tampão 1X, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,4 μM Rsa21, 3 U Taq DNA Polimerase (Fermentas Life Science) e 5 μL de reação de ligação de adaptadores, em volume final de 50 μL. O programa foi realizado em termociclador BIORAD PTC-100 Peltier, com desnaturação inicial a 95°C por 4 min; 30 ciclos a 94°C por 30 s, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min; e extensão final a 72°C por 8 min. A purificação dos produtos da reação foi realizada com *Quiaquick PCR Purification Kit* (QIAGEN) de acordo com fabricante.

Fragmentos contendo sequências SSR foram selecionados pelas sondas biotinoladas, Biotina-IIIII(CT)8 e Biotina-IIIII(GT)8, complementares às sequências repetitivas GA e CA, e recuperados pela *Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles* (Promega), de acordo com fabricante, e detalhado a seguir. O DNA purificado foi diluído na proporção 1:4 em água milli-Q (Millipore Corporation) e desnaturado a 95°C por 15 min. Ao DNA foram adicionados 13 μL de SSC 20X (3 M NaCl, 0,3M citrato de sódio, pH 7) e 3 μL de cada um dos oligos biotinolados e incubado à temperatura ambiente por 20 min. Em seguida, microesferas magnéticas pré-lavadas foram adicionadas a mistura de hibridização e incubada a temperatura ambiente por 10 min. Os fragmentos contendo SSR foram recuperados, após magnetização, através de lavagens das microesferas em SSC 0,1X, em 250 μL de água milli-Q e armazenado a –20°C.

O número de cópias dos fragmentos selecionados foi amplificado via PCR, com tampão 1X, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,4 μM de *Rsa*21, 3 U *Taq* DNA Polimerase (Fermentas Life Science) e 20 μL de suspensão de fragmentos selecionados, volume final de 100 μL. A reação foi realizada em termociclador BIORAD PTC-100 Peltier, com desnaturação inicial a 95°C por 4 min; 30 ciclos 94°C por 40 s, 60°C por 1 min e 72°C por 1 min; e extensão final a 72°C por 8 min. O produto da reação foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 1%, TBE 1X (100 V), corado com SYBR Safe (Invitrogen).

Os fragmentos amplificados foram clonados em pGEM-T *Easy Vector System* (Promega), de acordo com fabricante. Células de *Escherichia coli* linhagem TOP10 competentes quimicamente foram transformadas em dois eventos independentes e um evento controle (vetor sem inserto). No total 770 colônias brancas (clones transformados) foram isoladas com palitos estéreis (esterilizados em autoclave a 120°C por 20 min) e transferidas para meio 2YT-HMFM líquido (1,6% de triptona, 1% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl, 0,0076% de MgSO₄·7H₂O, 0,045% de citrato de sódio, 0,09% de (NH₄)₂SO₄, 4,4% de glicerol, 0,18% de KH₂PO₄ e 0,47% de K₂HPO₄), com 100 μg mL⁻¹ de ampicilina em placas do tipo ELISA (Costar), fechada com adesivo (ABgene) com furos para aeração. Os clones foram incubados a 37°C por 18 h e, em seguida, armazenados em *ultrafreezer* a −80°C, devidamente identificados.

3.4 Células quimicamente competentes e transformação genética

Recipientes, soluções e meios de cultura foram esterilizados em autoclave (120°C por 20 min), exceto glicerol. Colônia isolada e purificada de *E. coli* linhagem TOP10 foi incubada em 5 mL de meio LB líquido (0,1% de triptona, 0,05% de extrato de levedura, 0,1 % de NaCl, pH 7,0) a 37°C por 18 h. A suspensão bacteriana foi diluída na proporção 1:100 em meio LB e incubada a mesma condição com constante monitoramento, até atingirem leitura entre 0,5 e 0,6 em espectrofotômetro a 600 nm. E, em seguida, transferida para tubos de centrífuga prérefrigerados a 4°C, centrifugado a 5.000 rpm por 10 min (Rotina 380R, Hettich).

O sobrenadante foi descartado e as células, mantidas no gelo, foram ressuspendidas em 100~mL de 100~mM MgCl $_2$ pré-refrigerado e incubadas por 30~min. Após centrifugação (4.000 rpm por 10~min a 4°C), o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 10~mL de solução contendo 100~mM CaCl $_2$ e 15% de glicerol, pré-refrigerados. Alíquotas de $100~\text{\mu}\text{L}$ foram transferidas para tubos plásticos e armazenadas em ultrafreezer a -80°C .

Para transformação, 100 μL de células quimicamente competentes foram descongeladas em gelo, evitando assim a perda da viabilidade e competência, e misturada a 8 μL de vetor de clonagem e 32 μL de tampão de transformação (100 mM KCl; 30 mM CaCl₂; 50 mM MgCl₂; 1,5% PEG) e incubada em gelo por 5 min. O choque térmico foi realizado a 37°C por 10 min. Em seguida, 1 mL de LB líquido foi adicionado a mistura e incubada imediatamente a 37°C por 1 h. A suspensão foi aplicada em placas de Petri contendo LB com 10 mg mL⁻¹ de ampicilina, 60 μL de IPTG 20% e 90 μL de X-Gal 2% e incubadas a 37°C por 18 h. Colônias brancas contendo o plasmídeo de interesse foram isoladas com descrito no item anterior.

3.5 Sequenciamento de clones positivos

No total 192 clones aleatórios foram preparados para sequenciamento. Estes foram multiplicados em meio LB líquido contendo 100 μg mL⁻¹ de ampicilina em placa com 96 canaletas de poço fundo (ABgene), a 37°C por 22 h sob agitação a 300 rpm (G24 Environmental Incubator Shaker). A placa, com as suspensões bacterianas, foi centrifugada a 3.000 rpm por 6 min. O sobrenadante foi descartado e 240 μL de GTE (0,92% glicose, 26 mM

Tris-HCl pH 7,4, 10 mM EDTA pH 8) foram adicionados a cada poço, a placa foi agitada em vortex por 2 min. Após centrifugação a 4.000 rpm por 6 min, o sobrenadante foi descartado.

Foram adicionados 80 μL de GTE ao precipitado e agitado em vortex por 5 min, 60 μL da suspensão foi transferida para placa ELISA (Costar) contendo 5 μL de RNAse 10 mg mL⁻¹ (Ribonuclease A, Sigma) e 60 μL de 0,2 mM NaOH-1% SDS por poço. A placa foi misturada por inversão após selagem com adesivo selador (ABgene) e incubada a temperatura ambiente por 10 min. Após *spin* com rotação máxima de 1.000 rpm, 60 μL acetato de potássio 3 M gelado foram adicionados a cada poço e a placa misturada por inversão devidamente selada, e incubada a 90°C por 30 min. A placa, após esfriar no gelo por 10 min, foi centrifugada a 4.000 rpm por 4 min. O sobrenadante foi transferido para filtro (placa filtro, Millipore) acoplado a placa com fita adesiva e centrifugado a 4.000 rpm por 4 min a 20°C. Ao filtrado foram adicionados 110 μL de isopropanol. A placa foi misturada por inversão com adesivo selador (ABgene) e centrifugada a 4.000 rpm por 45 min a 20°C.

O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e cada precipitado lavado com 180 μL de etanol 70% gelado, seguido de centrifugação a 4.000 rpm por 5 min a 20°C. Após descarte do sobrenadante, os precipitados secaram em temperatura ambiente e foram ressuspendidos em 60 μL de água milli-Q. A qualidade da extração plasmidial foi verificada em eletroforese em gel de agarose 0,8%, TBE 1X (100 V), corado com SYBR Safe (Invitrogen), com marcador de peso molecular de 100 bp (Fermentas Life Science).

A reação da PCR para sequenciamento foi realizada com 2 μ L de tampão Save Money (5 mM MgCl₂, 200 mM Tris-HCl, pH 9), 5 pM iniciador SP6 (5'CATACG ATTTAGGTGACACTATAG 3'), 2 μ L da extração plasmidial e 0,4 μ L de BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) em volume final de 10 μ L. O programa apresentou desnaturação inicial a 96°C por 2 min; 26 ciclos 96°C por 45 s, 50°C por 30 s e 60°C por 4 min. A reação foi purificada antes do sequenciamento, em cada poço da placa foram adicionados 80 μ L de isopropanol 65%.

A placa foi deixada em repouso, ao abrigo da luz, por 15 min, e então centrifugada a 4.000 rpm por 45 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com $200~\mu L$ de etanol 70% e seco em temperatura ambiente, em local protegido da luz, por 1 h. O DNA foi ressuspendido em 4 μL de formamida deionizada (Hi-Di, Applied Biosystems). Antes do sequenciamento, as amostras foram desnaturadas em termociclador, a 90° C por 3 minutos, e

colocadas sobre gelo por 5 minutos. A placa foi embalada em papel alumínio e enviada para sequenciamento em sequenciador automático capilar 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) no Centro APTA Citros Sylvio Moreira, Cordeiropólis, São Paulo. As sequências obtidas foram processadas pelo 3730/3730xl Data Collection Software versão 3.0 (Applied Biosystems).

3.6 Identificação e análise de motivos microssatélites

Os eletroferogramas referentes ao sequenciamento dos clones foram recebidos em formato .ab1 e convertidos para o formato FASTA pelo programa BIOEDIT versão 7.0.9.0 (HALL, 1999). A verificação da qualidade e edição manual das sequências foram realizadas pelos programas CHROMAS versão 2.33 (Technelysium) e BIOEDIT versão 7.0.9.0 (HALL, 1999), respectivamente. Sequências de baixa qualidade em todo o seu comprimento foram excluídas. Sequências SSR foram identificadas pelo aplicativo WEBSAT (MARTINS et al., 2009) e apenas motivos com o mínimo de 10 bases foram anotados. As sequências dos adaptadores (*Rsa*21 e *Rsa*25) foram eliminadas antes do desenho dos iniciadores. A identificação de *contigs* e sequências redundantes foi realizada pelo programa SEQUENCHER versão 4.10.1 build 5828 (Gene Codes Corporation, 2009).

Os SSR foram classificados em relação à organização das repetições do motivo em: (*i*) perfeito, quando o motivo não é interrompido por nenhuma base diferente (p. ex. CTCTCTCTCTCT); (*ii*) imperfeito, quando há um par de bases diferente do motivo (p. ex. CTCTCTACTCT); (*iii*) interrompido, quando há mais de um par de bases interrompendo as repetições do motivo (p. ex. CTCTCTGGACACTCTCT); e (*iv*) composto, quando há dois ou mais motivos distintos adjacentes (p. ex. CTCTCTGAGAGAGA) (WEBER, 1990; PEAKALL et al., 1998).

3.7 Desenho de iniciadores

O desenho dos iniciadores foi realizado no programa PRIMER3 (ROZEN; SKALETSKY, 1999), com os seguintes parâmetros: (*i*) tamanho do fragmento amplificado variando entre 150 e 250 pb; (*ii*) tamanho entre 18 e 22 pb; (*iii*) temperatura de anelamento entre 57°C e 60°C; (*iv*)

variação de temperatura entre *forward* e *reverse* de 3°C; (*v*) percentagem de CG entre 40 e 60%; (*vi*) máxima complementaridade interna de 5 e máxima complementaridade na porção 3' de 3; e (*vii*) exclusão de iniciadores com três ou mais bases adenina ou timina na porção 3'. A probabilidade de formação de estruturas secundárias (*hairpins* e *loops*) foi verificada no programa GENERUNNER versão 3.05 (Hastings Software Inc., 1994). Os iniciadores com baixa probabilidade ou não ocorrência de estruturas secundárias foram escolhidos (ΔG inferior a –2; BRESLAUER et al., 1986). Os pares de iniciadores selecionados foram sintetizados pela empresa Eurofins.

Em 2007, Ortiz e colaboradores publicaram informações sobre uma biblioteca genômica de *Allium sativum* L. enriquecida com sequências SSR e posteriormente nova biblioteca genômica foi desenvolvida por Mariza Monteiro (dados não publicados), resultando nos iniciadores Asa01 a Asa24, que foram otimizados no presente trabalho. Ma et al. (2009) publicaram oito locos SSR polimórficos específicos para alho (GB-ASM-35, 40, 52, 59, 72, 78, 80 e 109) que foram também sintetizados e usados no presente trabalho.

3.8 Otimização das reações em cadeia da polimerase (PCR)

Os iniciadores foram testados com diferentes temperaturas de anelamento: (*i*) Asa01 ao Asa12, temperaturas de anelamento variando entre 48°C e 65°C; (*ii*) Asa13 ao Asa24, 45°C e 60°C; (*iii*) Asa25 ao Asa60, 50°C e 55°C; e (*iv*) GB-ASM-035, 40, 53, 59, 72, 80, 109, 45°C a 65°C. Diferentes concentrações de MgCl₂ (0,5 mM; 1 mM; 1,25 mM; 1,5 mM; 2 mM; 2,5 mM e 3mM) foram testadas para os iniciadores que apresentaram bandas fracas ou amplificação inespecífica. Os testes foram realizados com DNA de três acessos diferentes Roxo de Araras, Cateto Branco e Crespo. As concentrações dos reagentes da PCR foram: tampão 1X (Invitrogen); 1,5 mM MgCl₂ (Invitrogen); 0,2 mM dNTP (Fermentas Life Science); 0,2 μM de iniciadores *forward* e *reverse*; 1 U *Taq* polimerase caseira ou Invitrogen e 20 ng de DNA; para um volume final de 20 μL.

As reações foram realizadas em termociclador BIO-RAD MyClycler, com programa especificado por Ma et al. (2009), com desnaturação inicial a 94°C por 3 min; 30 ciclos a 94°C por 30 s, temperatura de anelamento específica por 45 s e 72°C por 1 min; 10 ciclos a 94°C por 30 s, temperatura de anelamento 2°C abaixo daquela especificada nos primeiros 30 ciclos por

45 s e 72°C por 1 min; e extensão final a 72°C por 10 min. O produto da reação foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 2%, TBE 1X (100 V), corado com SYBR Safe (Invitrogen), o tamanho do produto da amplificação foi estimado a partir de marcador de peso molecular de 100 bp (Fermentas Life Science). Produtos de reação, que apresentaram uma ou duas bandas de tamanho esperado, foram testados em gel de poliacrilamida 7%, como descrito a seguir.

3.9 Preparo do gel de poliacrilamida e eletroforese

A genotipagem dos acessos foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida 7%, preparado com 420 g de uréia, 233,4 mL de acrilamida:bisacrialamida 29:1 (LGC Biotecnologia) e 100 mL TBE 1X, aquecido a 40°C sob agitação. A solução foi filtrada duas vezes consecutivas em filtro de papel e armazenada em frascos de vidro escuro a 4°C.

Inicialmente, as placas de vidro (dimensão 35 x 45 cm) foram limpas com detergente e água corrente, seguida de etanol 70%. A placa *bind* foi tratada com 1 mL de ácido acético glacial 0,5%, etanol 99% e 5 μL de *PlusOne Bind Silane* (Amersham Pharmacia Biotech). A placa *repel* foi tratada com 1 mL de *PlusOne Repel-Silane ES* (Amersham Pharmacia Biotech). O gel foi preparado com 80 mL de acrilamida 7%, 160 μL de persulfato de amônio 10% e 160 μL de TEMED (tetrametiletilenodiamina; Serva) e vertido entre as placas com espessura de 0,4 mm.

Após polimerização, os géis foram posicionados nas cubas de eletroforese vertical EPS3500 (Pharmacia Biotech) e a placa foi aquecida em pré-corrida a 70 W (150 mA e 3.500 V), TBE 1X, por 60 min. As amostras foram preparadas com 6 μL de reação de PCR e 3 μL de tampão desnaturante (10 mM NaOH, xilenocianol 0,05%, azul de bromofenol 0,05% e 20 mM EDTA em formamida) e desnaturadas por 5 min a 95°C em termociclador e mantidas em gelo para serem aplicadas rapidamente no gel. O preparo das amostras com formamida evita a formação de bandas fantasmas e permite melhor distinção entre alelos próximos. No máximo foram aplicadas 80 amostras por gel e para determinação do tamanho do fragmento foi utilizado o marcador de peso molecular de 10 bp (Invitrogen). A eletroforese do gel ocorreu a 70 W por aproximadamente 3 h 30 min, com o tempo de corrida variando conforme o tamanho do fragmento esperado.

A coloração foi realizada de acordo com Sanguinetti, Dias Nero e Simpson (1994) com modificações. As etapas da coloração foram: (*i*) fixação, com etanol 10%, ácido acético glacial 1%, por 10 min; (*ii*) impregnação com nitrato de prata 0,2% por 20 min sob agitação; (*iii*) revelação com hidróxido de sódio 1,5%, formaldeído 0,15%, por 5 a 20 min; (*iv*) interrupção da revelação com ácido acético 5% por 3 min; e (*v*) lavagem em água destilada. Após secarem, as placas foram genotipadas manualmente com a ajuda de transiluminador (Konex).

3.10 Diversidade genética

Os genótipos dos 151 acessos de alho foram determinados através da interpretação de géis de poliacrilamida 7% para os 17 locos SSR polimórficos obtidos. A análise dos dados foi realizada considerando os 151 acessos em conjunto e separados em bancos de germoplasma (BAG), denominados IAC, ESALQ e Embrapa.

O número de alelos por loco (A), frequências alélicas, heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E), e *Polymorphism Information Content* (PIC; BOTSTEIN et al., 1980) foram calculados pelo suplemento para EXCEL MICROSATELLITE TOOLKIT (MSTOOLS; PARK, 2001). O programa GDA v.1.0 (LEWIS; ZAYKIN, 2009) foi utilizado para a identificação de alelos privados. A riqueza alélica corrigida para tamanho amostral (A_r) e sua variância (Var(A_r)) (EL MOUSADIK; PETIT, 1996; HURLBERT, 1971; KREBS, 1989) e o índice de diversidade de Shannon-Weaver (I_S; SHANNON; WEAVER, 1949) foram calculados pelo programa MICROSATELLITE ANALYSER (MAS v.4.05; DIERINGER; SCHLÖTTERER, 2003).

O teste exato para verificar se as segregações de cada loco por BAG estavam em concordância com aquelas esperadas em EHW foi calculado no programa FSTAT versão 1.2 (GOUDET, 1995), com 10.000 permutações e correção de Bonferroni com nível nominal a 5% de probabilidade. A identificação de genótipos multi locos idênticos (MLG) foi realizada pelo programa GENCLONE versão 2.0 (ARNAUD-HAOND; BELKHIN, 2007). Por fim, a coleção nuclear foi determinada pelo programa COREFINDER versão 1.0 (POLICRITI; SGARRO, 2011) através da estratégia M com 10 repetições, mantendo 100% dos alelos observados.

3.11 Estruturação genética

A estruturação genética entre os bancos de germoplasma foi verificada através das estatísticas G de Nei (1973, 1987), calculadas pelo programa FSTAT versão 1.2 (GOUDET, 1995), com os parâmetros: (*i*) heterozigosidade observada (H_O), (*ii*) diversidade gênica média dos BAGs (H_S), (*iii*) diversidade gênica total e corrigida para tamanho amostral (H_T e H_T', respectivamente); (*iv*) diversidade gênica média entre BAGs (D_{ST} e D_{ST}'), (*v*) diferenciação genética entre BAGs (G_{ST} e G_{ST}'), e (*vi*) G_{IS}, deficiência ou excesso de heterozigotos em média, a interpretação dos resultados foi realizada como descrito para as estatísticas F de Wright (1931), por serem análogas as estatísticas G (revisão em BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002; HOLSINGER; WEIR, 2009), e pela Análise de Variância Molecular (AMOVA), desenvolvida por Excoffier, Smouse e Quattro (1992) e calculada no programa ARLEQUIN versão 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010).

O programa STRUCTURE (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000) foi utilizado para determinação da estruturação genética dos acessos, através dos seguintes parâmetros: (i) 500.000 simulações de Cadeias de Markov Monte Carlo; (ii) com descarte inicial (burn in) de 500.000; (iii) modelo de ancestralidade sem miscigenação (no admixture); e (iv) modelo de frequências alélicas correlacionadas. Foram feitas cinco simulações para cada agrupamento (K), variando de 1 a 10. O K mais provável foi calculado pelo método de Evanno, Regnaut e Goudet (2005) pelo aplicativo STRUCTURE HARVESTER v.0.6.5 (EARL, 2011).

A matriz de distâncias genéticas de Rogers (1972) modificada por Wright (1978) (Rogers-W) foi obtida pelo programa TFPGA v.1.3 (MILLER, 1997) e usada na construção de dendrograma no programa NTSYS versão 2.1 (Exeter Software, Setauket, Nova Iorque; ROHLF, 2000), pelo critério de agrupamento UPGMA (SOKAL; MICHENER, 1958) e método SAHN (*Sequencial, Agglomerative, Hierarquical, and Nested*, SNEATH; SOKAL, 1973). A estabilidade dos agrupamentos foi testada através de 10.000 reamostragens *bootstrap* e pelo coeficiente de correlação cofenética, calculado pelo teste de Mantel com 1.000 permutações, no NTSYS versão 2.1 (Exeter Software, Setauket, Nova Iorque; ROHLF, 2000). A relação entre acessos foi também verificada pela Análise de Componentes Principais (PCA), utilizando a mesma matriz de distância genética da análise anterior, no programa PAST versão 2.09 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração de DNA

A extração de DNA garantiu que o precipitado final apresentasse coloração esbranquiçada a transparente, com baixa contaminação por polissacarídeos e compostos fenólicos, comumente presentes no alho. Somente para efeito ilustrativo, a qualidade e a concentração do DNA extraído dos acessos 1 ao 80 podem ser verificadas na Figura 1. Os demais acessos apresentaram resultados semelhantes.

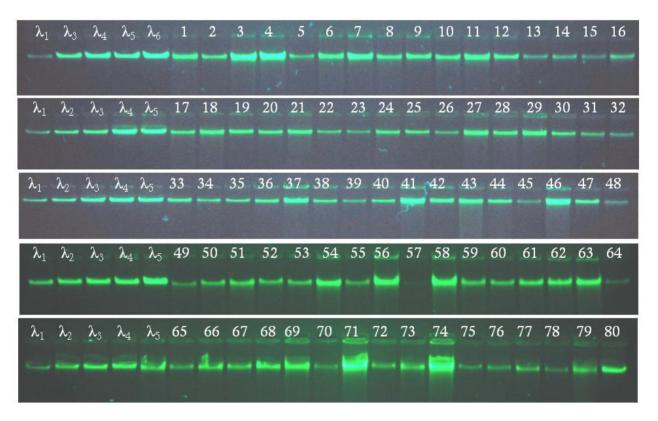


Figura 1 – Extração de DNA de 80 acessos de alho (*Allium sativum* L.) do banco de germoplasma do IAC e da ESALQ pelo protocolo de Doyle e Doyle (1990) com modificações. Análise da qualidade e concentração de DNA pela comparação com padrões de 50 ng (λ₁), 75 ng (λ₂), 100 ng (λ₃), 150 ng (λ₄), 200 ng (λ₅) e 300 ng (λ₆) de DNA do fago λ, através de eletroforese em gel de agarose 0,8%, TBE 1X (120 V), corado com SYBR Safe (Invitrogen)

4.2 Motivos microssatélites

O desenvolvimento da biblioteca genômica enriquecida com os motivos SSR, CT e GT, em alho resultou no isolamento de 768 clones, dos quais 192 tiveram a fita 5'-3' sequenciada. O tamanho médio das sequências originais foi de 847,9 pb, com redução para 526,5 pb após edição, com a deleção em média de 38% de nucleotídeos das extremidades 5' e 3' conjuntamente. No total, 32 sequências foram descartadas por apresentar picos sobrepostos e excesso de ruído.

Na análise dos eletroferogramas observou-se, em alguns casos, a terminação abrupta da sequência na região SSR. O aproveitamento das sequências poderia ser superior ao apresentado caso houvesse o sequenciamento de ambas as fitas de DNA. Além disso, esta estratégia garantiria que iniciadores 3' fossem desenhados em regiões mais confiáveis dos eletroferogramas.

No total, 40 motivos SSR, contendo no mínimo 10 bases, foram anotados em eletroferogramas de alta qualidade (Figura 2), nenhum deles redundantes ou formando *contigs*, representando uma eficiência de enriquecimento de aproximadamente 21% e reduzida para 18% após o desenho de iniciadores, pois apenas 35 sequências foram utilizadas. Em biblioteca genômica enriquecida com SSR desenvolvida para alho por Ma et al. (2009), o uso de maior número de endonucleases e de sondas biotiniladas di e trinucleotídeo resultaram em eficiência de enriquecimento 6% superior a apresentada neste trabalho, diferentemente 13% dos clones foi redundante.

A classe majoritária de SSR encontrados foram os perfeitos (93,4%), seguido de interrompidos (4,4%) e compostos (2,2%). Os motivos di (57,8%) e trinucleotídeos (28,9%) apresentaram destaque em relação a tetra e pentanucleotídeos (13,3%) (Figura 3). A relação completa dos motivos SSR isolados está disponível no Anexo C.

A classe de SSR dinucleotídeos perfeitos foi a de maior frequência com 25 motivos isolados, sendo 64% de (CT ou TC ou GA ou AG)n, 32% de (GT ou TG ou CA ou AC)n e 4% de (AT ou TA)n, com n repetições variando entre cinco e 28, com o intervalo entre cinco e oito repetições com maior número de sequências; apenas um motivo interrompido foi identificado para esta classe SSR (Figura 4). Os locos SSR dinucleotídeos perfeitos, com maior número de repetições, são ideais para obtenção de marcas altamente informativas por apresentarem níveis

de polimorfismo maior, em decorrência da taxa de mutação ser superior aos tri e tetranucleotídeos, por isso, são amplamente utilizados em estudos genéticos (ELLEGREN, 2004).

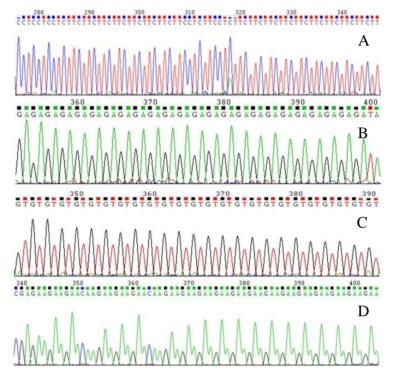


Figura 2 – Perfis de eletroferogramas de regiões SSR isoladas de biblioteca genômica de alho (*Allium sativum* L.), (A) Asa52, (B) Asa43, (C) Asa36 e (D) Asa29

A identificação de maior número de sequências SSR dinucleotídeos das classes (CT ou TC ou GA ou AG)n e (GT ou TG ou CA ou AC)n estão em concordância com o uso das sondas CT e GT. Estes motivos foram também os mais freqüentes em bibliotecas genômicas enriquecidas com SSR, utilizando sondas GA e CA, para 18 espécies das famílias Amaranthaceae, Araceae, Araliaceae, Brassicaceae, Ebenaceae, Fabaceae, Labiateae, Pedaliaceae, Poaceae, Polygonaceae, Rosaceae, Rutaceae e Zingiberaceae (Yu et al., 2009).

No total, 84,6% dos motivos trinucleotídeos foram perfeitos, com os motivos (CTT ou TTC)n e (TCC ou CTT)n com n repetições entre três e cinco de maior frequência. Motivos

maiores, como tetra e pentanucleotídeos perfeitos, foram raros e apresentaram de três a cinco repetições, curiosamente, um dos pentanucleotídeos apresentou cinco repetições. A baixa frequência de tetra e pentanucleotídeos também foi relatada por Yu et al. (2009) e Ma et al. (2009).

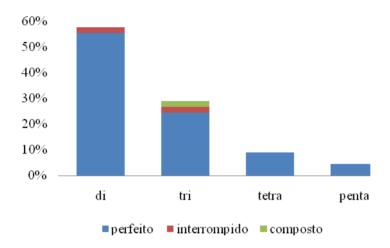


Figura 3 – Percentagem de sequências SSR com motivos di, tri, tetra e pentanucleotídeo das classes perfeito, interrompido e composto encontradas em biblioteca genômica de alho (*Allium sativum* L.)

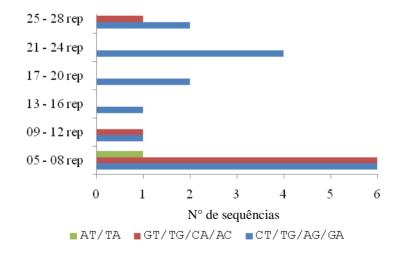


Figura 4 – Número de repetições de motivos SSR dinucleotídeos (AT ou TA)n, (GT ou TG ou CA ou AC)n e (CT ou TG ou AG ou GA)n encontrados em biblioteca genômica de alho (*Allium sativum* L.)

4.3 Iniciadores para locos microssatélites

A partir da biblioteca genômica desenvolvida, 36 novos pares de iniciadores SSR foram desenhados (Asa25 a Asa60). No total, 16 iniciadores foram otimizados, 10 polimórficos e seis monomórficos (Tabela 1), e dos oito iniciadores disponíveis na literatura (MA et al., 2009), sete foram polimórficos (Tabela 2). Para efeito ilustrativo os perfis genotípicos em gel de poliacrilamida 7% para quatro locos SSR são apresentados na Figura 5. O trabalho foi concluído com 17 iniciadores polimórficos para análise da diversidade e estruturação genética de BAGs de alho. A melhor concentração de MgCl₂ foi de 1,5 mM para todas as reações de PCR.

Para os demais iniciadores, a grande maioria dos produtos da PCR, visualizados em géis de poliacrilamida 7%, resultou em (*i*) excesso de bandas, provavelmente devido ao tamanho do genoma do alho, que possui duplicações (OHRI; FRITSCH; HANELT, 1998; IPEK et al., 2005), inviabilizando o uso de alguns locos e (*ii*) amplificação observada em gel de agarose durante teste inicial e não amplificação em volumes de reações maiores, provavelmente devido à instabilidade de amplificação como observado por Volk et al. (2004) em marcas AFLP.

Tabela 1 – Novos iniciadores SRR para alho (*Allium sativum* L.)

| Loco | – Novos iniciadores SRR para aino (A Iniciadores | Motivo e repetições | Ta (°C) | Alelos (pb) | Genbank | |
|-------|--|----------------------|---------|-----------------------|-------------------|--|
| | (5'-3') | | (0) | 1210105 (p 2) | ID | |
| Asa04 | F: AGACTTTTGGAGGCTAGGGC | (TCC)5 (TCC)4 (TCC)5 | 54 | 264 | JN084085 | |
| | R: CCCTGGTCTCTTTCAACCAA | | | | 311001005 | |
| Asa06 | F: GGGGTGTTACATTCTCCCCT | (TG)5 | 57 | 192 | JN084086 | |
| | R: ACCGCCTGATTTTGCATTAG | | | | 311004000 | |
| Asa07 | F: CTCGGAACCAACCAGCATA | (TG)7 | 58 | 229-235 (6) | JN084087 | |
| | R: CCCAAACAAGGTAGGTCAGC | | | | 311001007 | |
| Asa08 | F: TGATTGAAACGAATCCCACA | (GT)8 | 56 | 209-257 (28) | JN084088 | |
| | R: GGGGTTACCTGAACCTGTTA | | | | 311001000 | |
| Asa10 | F: TTGTTGTTCTGCCATTTT | (AC)7 | 48 | 225-239 (14) | JN084089 | |
| | R: GATCTAAGCCGAGAGAAA | | | | 311001007 | |
| Asa14 | F: TCTATCTCGCTTCTCAGGGG | (GT)7 | 48 | 220-234 (14) | JN084090 | |
| | R: CTGACAGAAGTAGTCTTTCC | | | | 3 11001070 | |
| Asa16 | F: CACGACTTTTCCTCCCATTT | (TG)5 C (GT)6 | 48 | 148-154 (6) | JN084091 | |
| | R: CTAATGTTCATGTCCCCAGT | | | | 3 11001071 | |
| Asa17 | F: TCCACGACACACACACAC | (CA)12 (CT)28 | 56 | 126-196 (70) | JN084092 | |
| | R: ATGCAGAGAATTTGGCATCC | | | | | |
| Asa18 | F: TCAAGCTCCTCCAAGTGTCC | (TG)8 | 45 | 254-264 (10) | JN084093 | |
| | R: TCGGGATATGACAGCATTTG | | | | \$11001075 | |
| Asa20 | F: GAAGCAGCAAAGATCCAAGC | (G)12 | 48 | 260 | JN084094 | |
| | R:CGTGCAGAACTTAACCTT | | | | 111001071 | |
| Asa23 | F: GGAGGGGAAAAAGGATAG | (GA)5 | 55 | 271 | JN084095 | |
| | R: TGTGAAGCAAGTGGGATCAA | | | | 011001000 | |
| Asa24 | F: TTGTTGTGCCGAGTTCCATA | (GT)4 (GT)3 (GT)5 | 48 | 149-161 (12) | JN084096 | |
| | R: AGCAATTTACCAAAGCCAAG | | | | 011001000 | |
| Asa25 | F: GCACTTCACTTTCCCCATTC | (CT)3 (CT)27 | 51 | 117-127 (10) | JN084097 | |
| | R: GGCGACGGTGAAGAGAGAG | | | | | |
| Asa27 | F: GGGAGAGAATGGCTTGATTG | (TC)17 (TC)5 | 55 | 127 | JN084098 | |
| | R: GGACAGCATCATCACCAC | | | | 3 11001070 | |
| Asa31 | F: CAGAGACTAGGGCGAATGG | (CTT)7 | 50 | 237-243 (6) | JN084099 | |
| | R: ATGATGATGACGACGAC | | | . , | 221001077 | |
| Asa59 | F: CGCTTACTATGGGTGTGTC | (ATCA)3 | 50 | 290 | JN084100 | |
| | R: CAAGTGGGAGACTGTTGGAG | ` ' | | | JINU84100 | |

Notas: Ta, temperatura de anelamento; Alelos, tamanho dos alelos em pb e em parênteses variação em pb entre o maior e menor alelo; Genbank ID, localizador da sequência de nucleotídeos no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

| Tabela 2 – Iniciadores | SSR pa | ra alho | (Allium | sativum L.) | desenvolvidos | por Ma | et al. | |
|------------------------|--------|---------|---------|-------------|---------------|--------|--------|--|
| (2009) | _ | | | | | _ | | |

| Loco | Motivo e repetições | Ta (°C) | Alelos (pb) |
|------------|------------------------------|---------|--------------|
| GB-ASM-035 | (GCC)3 (TCC)3 | 50 | 304 |
| GB-ASM-040 | (AC)6 (AC)14 (AT)5 | 50 | 252-298 (46) |
| GB-ASM-053 | (CA)15 (AC)8 | 50 | 160-168 (8) |
| GB-ASM-059 | (TG)11 (TG)5 | 50 | 260-295 (35) |
| GB-ASM-072 | (TA)7 (TG)5 GC (GT)9 T (TG)8 | 45 | 182-188 (6) |
| GB-ASM-078 | (GT)12 | 50 | 184-218 (34) |
| GB-ASM-080 | (CCG)5 | 45 | 152-158 (6) |
| GB-ASM-109 | (ACC)4 | 45 | 202-224 (22) |

Notas: Ta, temperatura de anelamento; Alelos, tamanho dos alelos em pb e em parênteses variação em pb entre o maior e menor alelo.

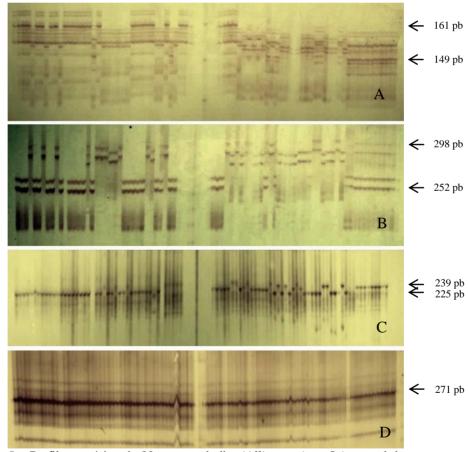


Figura 5 – Perfil genotípico de 80 acessos de lho (*Allium sativum* L.) em gel de poliacrilamida 7%; (A) Asa24, (B) GB-ASM-040 e (C) Asa10, polimórficos, e (D) Asa23, monomórfico

4.4 Genótipos multi locos idênticos (MLGs)

O número de genótipos multi locos (Multi Loci Genotypes, MLGs) foi identificado para cada um dos BAGs avaliados. MLGs contendo um único acesso representante foram identificados pelo nome do próprio acesso e MLGs com mais de um representante foram identificados pelas letras (A a L) ou números romanos (I a XI) (Tabela 3 e Tabela 4). No total foram identificados no (i) IAC, 6 MLGs: Sacaia Goiânia, BGH-0525, Formosa I-4713, Peruano Bisão ESALQ, 'MLG A' e 'MLG B'; (ii) ESALQ, 2 MLGs: Crespo e 'MLG C'; e (iii) Embrapa, 58 MLGs: Barbado, Branco Dourado, Branco Mineiro, Caturra, Centralina A, Chinês Real, Cuiabá, Dourado, Gigante de Inconfidentes – bulbos longos, Gigante Roxão, Hozan, Inconfidentes II, Inhumas A, Inhumas Casca Roxa, Jacobina, Jundiaí, Juiz de Fora, Juréia, Morano Arequipeno, Mucugê, Novo Cruzeiro, Paraíba III, Peruano, Pinheiral, Piracicabano Amaralino, Tempero de Bode, Ugarte, DDR6024, DDR6807, DDR6822, PI38383, PI540318, PI540351, RAI27, RAI41, RAI75, RAI159, RAI751, RE PSK, RE6820, UO73, UO74, UO79-3, UO94-5, UO94-11, WE8407, WE10735, WE12832, Quitéria e 'MLG D' a 'MLG L'. Com a identificação de MLGs os BAGs do IAC, ESALQ e Embrapa foram reduzidos em 90,5%, 88,2% e 18,3%, respectivamente. Na análise conjunta dos BAGs foram identificados 65 MLGs, 54 com um único acesso representante e 11 contendo mais de um acesso, 'MLG I' a 'MLG XI' (Tabela 4). O 'MLG B' (IAC) e 'MLG C' (ESALQ) na análise conjunta representam um único MLG, 'MLG XI'.

Tabela 3 – Genótipos multi locos idênticos (MLGs) com mais de um acesso representante dos bancos de germoplasma de alho (*Allium sativum* L.) do IAC, ESALQ e Embrapa

(continua)

| MLG | N° de acessos | Identificação dos acessos |
|-----|--|--|
| A | 9 | Canela de Ema, Cará, Mineiro, Gravatá A, Do Reino I-2118, Mossoró, Santa Catarina |
| A | 9 | Branco, BGH-5936 e Roxo de Minas (Dr. Joaquim) |
| | | BGH-4814, BGH-4823, BGH-4842, BGH-5935, BGH-5947, BGH-5952, BGH-5963, |
| | | BGH-6394, Roxo de Araras, Roxo de Araras (2), Andradas Manoel Lopez, Andradas |
| | | Manoel Lopez (2), Assaí I-3703, Piedade, Santa Catarina Roxo, Chinês I-4653, |
| | | Roxinho I-5063, Peruano Bisão, Amarante, Mexicano Br, Roxo Capim Branco I-3969, |
| D | 50 | Cateto Precoce I-1634, Alho Bepe, Lavínia I-3208, Lavínia I-1632, Lavínia IAC-1632 |
| В | 30 | (2), Bom Repouso I-5085, São José I-4999, Catetinho do Paraná I-1234, Mendonça I- |
| | | 5062, Tatuí I-3705, Gigante Tietê I-4652, Gigante de Curitibanos, Areal n°2 I3968, |
| | Vera Cruz I-5004, Chinês-ESALQ, Chinês-ESA | Vera Cruz I-5004, Chinês-ESALQ, Chinês-ESALQ (2), Cateto Roxo I-99, Bulbinho |
| | | Aéreo, Sr. Wilson (Bairro Godoí), Bulbinho Aéreo Gigante de Curitibanos, Chinês |
| | | Mogi, A, B, C, D, E, F e Embrapa Cateto Roxo Livre de Vírus |

Tabela 3 – Genótipos multi locos idênticos (MLGs) com mais de um acesso representante dos bancos de germoplasma de alho (*Allium sativum* L.) do IAC, ESALQ e Embrapa

(conclusão)

| MLG | N° de acessos | Identificação dos acessos |
|-----|---------------|---|
| | | Gigante, Centenário, Gigante Dez, São José, Lavínia, Caiano Branco, Cateto |
| C | 16 | Branco, Gigante Vinte, Cajuru, Peruano, Ouro Fino, Sergipe, Mineiro Branco, |
| | | Babás, Chinês Quatapara e Chinês-ESALQ (3) |
| D | 2 | Catiguá e Chileno (PR) |
| E | 2 | Gravatá e Roxo Dourado |
| F | 2 | Mexicano e Mexicano A |
| G | 2 | DDR6804 e DDR6811 |
| H | 3 | Araguari, Gigante de Lavínia e Gigante Roxo |
| I | 3 | Chonan, Roxo Pérola de Caçador e Jonas |
| J | 2 | Mexicano B, Mexicano II |
| K | 2 | Santa Izabel e Seleção I |
| L | 4 | Ito, San Valentin, Roxo Caxiense e Bergamota |

Notas: MLG A a B, banco de germoplasma do IAC; MLG C, banco de germoplasma da ESALQ; e MLG D a K, banco de germoplasma da Embrapa.

Tabela 4 – Genótipos multi locos idênticos (MLGs) com mais de um acesso representante identificados na análise conjunta dos bancos de germoplasma de alho (*Allium sativum* L.) do IAC, ESALQ e Embrapa

| MLG | N° acessos | Identificação de acessos |
|------|------------|---|
| I | 2 | Catiguá e Chileno (PR) |
| II | 2 | Gravatá e Roxo Dourado |
| III | 2 | Mexicano e Mexicano A |
| IV | 2 | Mexicano B e Mexicano II |
| V | 2 | DDR6804 e DDR6811 |
| VI | 2 | Santa Izabel e Seleção I |
| VII | 3 | Araguari, Gigante de Lavínia e Gigante Roxo |
| VIII | 3 | Chonan, Roxo Pérola de Caçador e Jonas |
| IX | 4 | Ito, San Valentin, Roxo Caxiense e Bergamota |
| X | 9 | Canela de Ema, Cará, Mineiro, Gravatá A, Do Reino I-2118, Mossoró, Santa |
| Λ | 9 | Catarina Branco, BGH-5936 e Roxo de Minas (Dr. Joaquim) |
| XI | 66 | BGH-4814, BGH-4823, BGH-5947, Roxo de Araras, Roxo de Araras (2), Andradas Manoel Lopez, Andradas Manoel Lopez (2), Assaí I-3703, Piedade, Santa Catarina Roxo, Chinês I-4653, Roxinho I-5063, Roxinho I-5063 (2), Peruano Bisão, Amarante, Mexicano Br, Roxo Capim Branco I-3969, Cateto Precoce I-1634, Alho Bepe, Lavínia I-3208, Lavínia I-1632, Lavínia IAC-1632 (2), Bom Repouso I-5085, BGH-5935, São José I-4999, BGH-4842, Catetinho do Paraná I-1234, Mendonça I-5062, Tatuí I-3705, Gigante Tietê I-4652, Gigante de Curitibanos, Areal n°2 I-3968, Vera Cruz I-5004, Chinês-ESALQ, Chinês-ESALQ (2), Chinês-ESALQ (3), Cateto Roxo I-99, BGH-5963, BGH-6394, BGH-5952, Bulbinho Aéreo, Sr. Wilson (Bairro Godoí), Bulbinho Aéreo Gigante de Curitibanos, Chinês Mogi, Gigante, Centenário, Gigante Dez, São José, Lavínia, Caiano Branco, Cateto Branco, Gigante Vinte, Cajuru, Peruano, Ouro Fino, Sergipe, Mineiro Branco, Babás, Chinês Quatapara, A, B, C, D, E, F e Embrapa Cateto Roxo Livre de Vírus |

4.5 Caracterização dos locos microssatélites

A diversidade e o polimorfismo dos locos SSR foram investigados pelos parâmetros: número médio de alelos por loco (A), riqueza alélica (A_r), índice de Shannon-Weaver (I_S) e PIC (Tabela 5). A média de alelos observada por loco foi de 5,3, com máximo de 13 alelos para os locos GB-ASM-040 e GB-ASM-059. A A_r estimada variou entre locos, com mínimo 1,434 (Asa18) e máximo de 3,312 (GB-ASM-040), com média de 2,258. O I_S também apresentou variação entre locos de 0,389 (Asa18) a 2,246 (GB-ASM-040), com média de 1,176.

O PIC médio foi de 0,545, com ampla variação entre locos, de 0,202 (Asa18) a 0,851 (GB-ASM-040). Os locos foram agrupados em: (*i*) não informativos (PIC menor ou igual a 0,30), Asa16, Asa18 e GB-ASM-080; (*ii*) moderadamente informativos (PIC entre 0,30 e 0,60), Asa07, Asa17, Asa31, GB-ASM-053, GB-ASM-072 e GB-ASM-078; e (*iii*) altamente informativos (PIC maior ou igual a 0,60), Asa08, Asa10, Asa14, Asa24, Asa25, GB-ASM-040, GB-ASM-059 e GB-ASM-109.

A maioria das marcas neste estudo apresentou nível de informação adequado para estudos genéticos. Dos 14 locos SSR informativos, oito foram desenvolvidos no presente trabalho. É importante ressaltar, que mesmo as marcas pouco informativas podem ser úteis em estudos de outras coleções.

Tabela 5 – Parâmetros de diversidade e polimorfismo utilizados para a descrição de locos SSR em alho (*Allium sativum* L.)

| Loco | n | A | $\mathbf{A_r}$ | Var(A _r) | I_S | PIC |
|-------------------|----|-----|----------------|----------------------|-------|-------|
| Asa07 | 65 | 3 | 1,915 | 0,167 | 0,750 | 0,391 |
| Asa08 | 65 | 8 | 2,997 | 0,483 | 1,752 | 0,772 |
| Asa10 | 65 | 5 | 2,524 | 0,477 | 1,282 | 0,625 |
| Asa14 | 64 | 4 | 2,640 | 0,441 | 1,319 | 0,665 |
| Asa16 | 65 | 2 | 1,624 | 0,235 | 0,521 | 0,281 |
| Asa17 | 62 | 5 | 2,092 | 0,386 | 0,966 | 0,453 |
| Asa18 | 65 | 2 | 1,434 | 0,246 | 0,389 | 0,202 |
| Asa24 | 65 | 7 | 2,816 | 0,521 | 1,582 | 0,718 |
| Asa25 | 58 | 6 | 2,750 | 0,506 | 1,511 | 0,696 |
| Asa31 | 58 | 2 | 1,853 | 0,125 | 0,674 | 0,366 |
| GB-ASM-040 | 64 | 13 | 3,312 | 0,461 | 2,246 | 0,851 |
| GB-ASM-053 | 65 | 4 | 2,142 | 0,421 | 0,971 | 0,492 |
| GB-ASM-059 | 65 | 13 | 3,254 | 0,478 | 2,173 | 0,837 |
| GB-ASM-072 | 65 | 3 | 1,656 | 0,226 | 1,072 | 0,573 |
| GB-ASM-078 | 65 | 5 | 2,194 | 0,379 | 1,044 | 0,503 |
| GB-ASM-080 | 53 | 2 | 1,492 | 0,250 | 0,429 | 0,226 |
| GB-ASM-109 | 35 | 6 | 1,693 | 0,213 | 1,320 | 0,607 |
| Média | 65 | 5,3 | 2,258 | 0,354 | 1,176 | 0,545 |

Notas: n, número de acessos genotipados; A, número de alelos observado; A_r , estimativa da riqueza alélica calculada para tamanho amostral mínimo (2 indivíduos); $Var(A_r)$, variância da riqueza alélica; I_s , índice de Shannon-Weaver e PIC, *Polymorphism Information Content*.

4.6 Diversidade genética dos bancos de germoplasma

A genotipagem dos 151 acessos, utilizando os 17 locos SSR polimórficos, permitiu a identificação de 90 alelos distintos, com as frequências alélicas representadas em gráfico de barras (Figura 6 e Anexo D). No A maioria dos alelos (34%) foi considerada raro, com frequência igual ou inferior a 5% (Figura 7), e 43 alelos foram privados ou exclusivos (48%), sendo quatro do IAC e 39 da Embrapa. Todos os locos foram polimórficos para IAC e Embrapa e apenas dois para ESALQ. Os índices utilizados para quantificação da diversidade genética nos BAGs do IAC, ESALQ e Embrapa para todos os acessos e MLGs são apresentados na Tabela 6.

A heterozigosidade estimada para o BAG da ESALQ (H_O 0,471 e H_E 0,244) foi inferior aos demais BAGs avaliados devido ao baixo polimorfismo encontrado nos locos avaliados. A

heterozigosidade para os BAGs do IAC e Embrapa foram próximos as médias da H_O (0,500) e H_E (0,539). Considerando apenas os MLGs, as heterozigosidades nos BAGs apresentaram valores semelhantes, com H_O variando entre 0,500 e 0,523 e média de 0,520 e H_E variando entre 0,396 e 0,598 e média de 0,604.

O BAG da Embrapa apresentou riqueza alélica (4,325) e índice de Shannon-Weaver (1,121), ambos os valores foram superiores aos demais BAGs. Considerando apenas MLGs, a riqueza alélica para Embrapa e IAC apresentou valores idênticos, devido à padronização para tamanho amostral mínimo realizada para este índice, o que é vantagem em alguns casos por permitir a comparação entre amostras de tamanhos diferentes. No entanto, neste contexto, o índice de Shannon-Weaver é mais interessante para comparação de acessos e MLGs por combinar dois atributos importantes, riqueza de alelos e abundância. Assim, como esperado, há redução da amplitude do índice de Shannon-Weaver quando comparando acessos e MLGs. Para acessos, o índice de Shannon-Weaver variou de 1,121 (Embrapa) a 0,333 (IAC) (variação de 0,788), enquanto para MLGs a variação foi bem menor de 1,040 (IAC) a 1,530 (Embrapa) (variação de 0,490).

Tabela 6 – Índices de diversidade obtidos para bancos de germoplasma (BAG) de alho (*Allium sativum* L.) utilizando marcadores SSR

| BAG | N | $\mathbf{H}_{\mathbf{O}}$ | $\mathbf{H}_{\mathbf{O}}$ $\mathbf{H}_{\mathbf{E}}$ | | $\mathbf{A_r}$ | $\mathbf{I_S}$ |
|--------------|-----|---------------------------|---|-----|----------------|----------------|
| MLGs | | | | | | |
| IAC | 6 | 0,529 | 0,598 | 2,9 | 2,241 | 1,220 |
| ESALQ | 2 | 0,500 | 0,396 | 1,5 | 1,529 | 1,040 |
| Embrapa | 58 | 0,523 | 0,595 | 5,0 | 2,241 | 1,530 |
| Média | 65 | 0,520 | 0,604 | 5,3 | 2,258 | 1,530 |
| Acessos | | | | | | |
| IAC | 63 | 0,499 | 0,418 | 2,9 | 2,801 | 0,714 |
| ESALQ | 17 | 0,471 | 0,244 | 1,5 | 1,529 | 0,333 |
| Embrapa | 71 | 0,521 | 0,584 | 5,0 | 4,325 | 1,121 |
| Média | 151 | 0,500 | 0,539 | 5,3 | 2,885 | 0,723 |

Notas: N, número total de acessos; H_E e H_O , heterozigosidade esperada e observada; A, número médio de alelos por loco; A_r , estimativa da riqueza alélica calculada com tamanho amostral mínimo; e I_S , Índice de Shannon-Weaver.

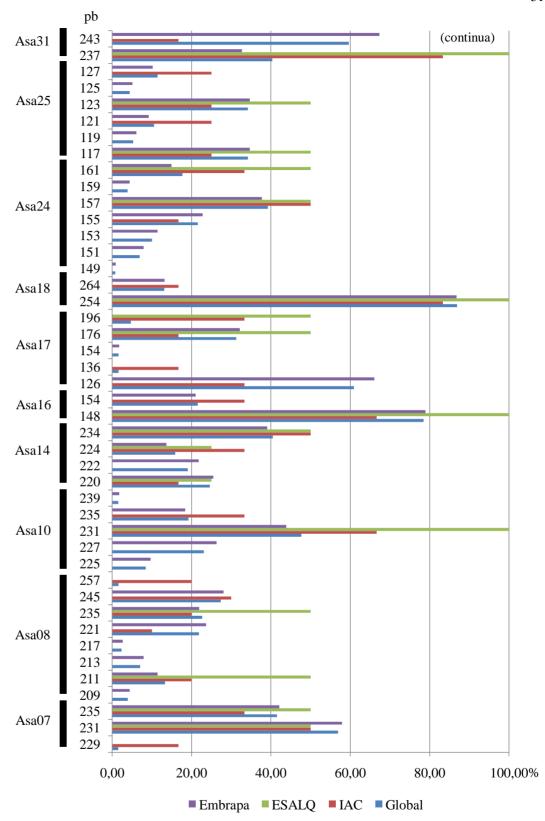


Figura 6 – Distribuição das frequências alélicas dos 90 alelos encontrados em acessos de alho (*Allium sativum* L.) nos bancos de germoplasma do IAC (vermelho), ESALQ (verde), Embrapa (roxo) e global (azul), utilizando 17 locos SSR

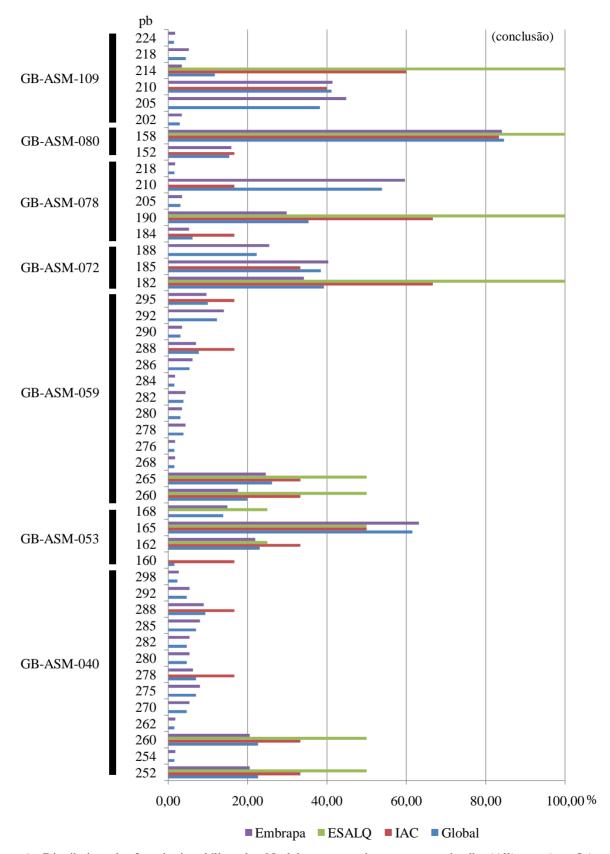


Figura 6 – Distribuição das frequências alélicas dos 90 alelos encontrados em acessos de alho (*Allium sativum* L.) nos bancos de germoplasma do IAC (vermelho), ESALQ (verde), Embrapa (roxo) e global (azul), utilizando 17 locos SSR

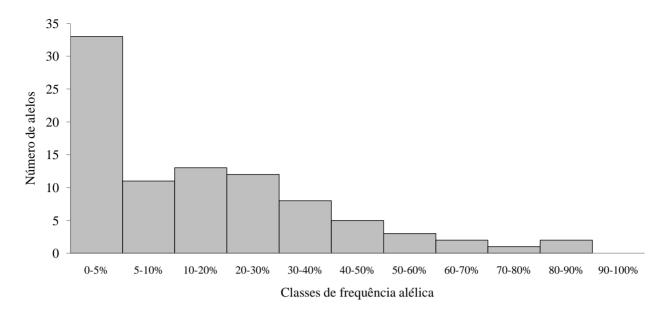


Figura 7 – Histograma das frequências de 90 alelos encontrados em bancos de germoplasma de alho (*Allium sativum* L.) utilizando 17 locos SSR

As medidas de diversidade genética apresentadas serão úteis no delineamento de estratégias para manutenção de acessos pelos curadores das coleções. Considerando os 17 locos SSR, (i) o BAG da ESALQ apresentou baixa variabilidade genética, com acessos geneticamente idênticos aos do IAC, com exceção de Crespo; (ii) o IAC apesar do número restrito de MLGs identificados, apresentou alelos privados e alta diversidade genética entre MLGs; e (iii) Embrapa apresentou destaque em relação ao número de MLGs, alelos privados e índices de diversidade genética, indicando alto valor genético devido a presença de acessos bem distintos.

Apesar da clara redução das coleções depois da identificação de MLGs (151 acessos representaram 65 MLGs), pode-se concluir que existe alta variabilidade genética nos BAGs brasileiros avaliados, considerando a propagação vegetativa e apomixia presentes na espécie. A elevada variabilidade genética observada em clones pode estar relacionada à provável reprodução sexual em ancestrais seguida de múltiplos eventos de domesticação ou acúmulo de mutações somáticas, que devido à falta de melhoramento genético clássico, é perpetuada, mantendo o grau de domesticação em níveis baixos (BRADLEY; RIEGER; COLLINS, 1996; LISBÃO et al., 1993).

4.7 Coleção nuclear

A definição de uma coleção nuclear facilita a manutenção de acessos de alho em BAGs de alho, que requer excessiva mão-de-obra, com cura, vernalização, plantio, tratos culturais e colheita, além de evitar a perda de alelos de interesse ou distintos. A coleção nuclear dos bancos de germoplasma conjuntamente foi constituída por 16 acessos, a saber, Sacaia Goiânia, BGH-0525, Formosa I-4713, BGH-5936, São José, Chinês Real, Hozan, Mexicano A, Novo Cruzeiro, Peruano, Pinheiral, RE6820, UO73, UO79-3, WE8407 e WE10735.

A coleção nuclear para o BAG do IAC incluiu cinco acessos, Canela de Ema, Formosa I-4713, BGH-5947, BGH-5936 e Peruano Bisão ESALQ e da ESALQ somente dois acessos São José e Crespo. A coleção nuclear da Embrapa foi formada por 14 acessos: Branco Mineiro, Chinês Real, Hozan, Juiz de Fora, Mucugê, Peruano, Pinheiral, Ugarte, DDR6804, DDR6807, PI540351, RE PSK, WE8407 e WE10735. As coleções nucleares estabelecidas apresentaram reduzido número de acessos e sua manutenção garantirá que a máxima variabilidade genética observada nas coleções seja preservada, com economia de tempo e mão-de-obra.

Apesar da alta redundância presente nos BAGs de alho e do baixo número de acessos nas coleções nucleares, recomenda-se cautela na eliminação de acessos, devido à alta variabilidade morfológica encontrada entre clones. Por exemplo, apesar da baixa diversidade genética identificada entre acessos do BAG da ESALQ, a análise morfológica em dois ambientes e duas épocas revelou elevada variabilidade (HOOGERHEIDE, 2009). Os dados de marcadores SSR deverão ser analisados em conjunto com dados agromorfológicos, isoenzimáticos, moleculares e epigenéticos para garantir uma confiável identificação de duplicatas e de coleções nucleares em sintonia com os interesses específicos de cada melhorista e seus respectivos programas de melhoramento.

4.8 Estruturação genética dos bancos de germoplasma e MLGs

O teste Exato para determinar a aderência das segregações dos 17 locos SSR ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi realizado com 10.000 permutações, com correção de Bonferroni para nível nominal de probabilidade a 5%. Nenhum dos locos analisados

apresentou segregação em EHW, o que já era esperado, por se tratar de material em BAGs (Tabela 7).

Tabela 7 – Teste exato para determinar aderência das segregações ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) de 17 locos SSR em bancos de germoplasma (BAG) de alho (*Allium sativum* L.)

| Loco | p-valor | | | | | | | |
|-------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|--|--|--|--|--|
| Loco | IAC | ESALQ | Embrapa | | | | | |
| Asa07 | 1,0000 ^{n.s.} | 1,0000 ^{n.s.} | 0,0333 ^{n.s.} | | | | | |
| Asa08 | 1,0000 ^{n.s.} | 1,0000 ^{n.s.} | 1,0000 ^{n.s.} | | | | | |
| Asa10 | $0,0010^{\text{ n.s.}}$ | | $0,0010^{\text{ n.s.}}$ | | | | | |
| Asa14 | 1,0000 ^{n.s.} | 1,0000 ^{n.s.} | 0,9745 ^{n.s.} | | | | | |
| Asa16 | $0,0010^{\text{ n.s.}}$ | | $0,0010^{\text{ n.s.}}$ | | | | | |
| Asa17 | 0,0010 ^{n.s.} | | 0,0010 ^{n.s.} | | | | | |
| Asa18 | 1,0000 ^{n.s.} | | 1,0000 ^{n.s.} | | | | | |
| Asa24 | 1,0000 ^{n.s.} | 1,0000 ^{n.s.} | 1,0000 ^{n.s.} | | | | | |
| Asa25 | 1,0000 ^{n.s.} | 1,0000 ^{n.s.} | 1,0000 ^{n.s.} | | | | | |
| Asa31 | $0,0010^{\text{ n.s.}}$ | | $0,0010^{\text{ n.s.}}$ | | | | | |
| GB-ASM-040 | 1,0000 ^{n.s.} | 1,0000 ^{n.s.} | 1,0000 ^{n.s.} | | | | | |
| GB-ASM-053 | 1,0000 ^{n.s.} | 1,0000 ^{n.s.} | 1,0000 ^{n.s.} | | | | | |
| GB-ASM-059 | 1,0000 ^{n.s.} | 1,0000 ^{n.s.} | 1,0000 ^{n.s.} | | | | | |
| GB-ASM-072 | $0,0010^{\text{ n.s.}}$ | | $0,0010^{\text{ n.s.}}$ | | | | | |
| GB-ASM-078 | $0,0010^{\text{ n.s.}}$ | | $0,0010^{\text{ n.s.}}$ | | | | | |
| GB-ASM-080 | 0,0010 ^{n.s.} | | $0,2510^{\text{ n.s.}}$ | | | | | |
| GB-ASM-109 | 0,0010 ^{n.s.} | • | 1,0000 ^{n.s.} | | | | | |
| Total | 1,0000 ^{n.s.} | 1,0000 ^{n.s.} | 0,0100 ^{n.s.} | | | | | |

Nota: n.s., valor não significativo; o valor nominal a 5% de probabilidade foi 0,00098.

Sinal convencional utilizado:

A estruturação genética entre BAGs de alho foi investigada pelas estatísticas G, considerando os 65 MLGs identificados (sem redundância) e 151 acessos (número total de acessos) (Tabela 8). Considerando a coleção total, o coeficiente de diferenciação gênica (\hat{G}_{ST} ') foi de 0,200, o que indica que a variação genética observada está estruturada 20% entre e 80% dentro dos BAGs. Valores de \hat{G}_{ST} ' em BAG de alho da Coreia do Sul (0,156) (ZHAO et al., 2011) e cebolinha (*Allium fistulosum*) (0,240) (TSUKAZAKI et al., 2010) foram similares ao apresentado neste trabalho. A alta variação genética dentro das coleções era esperada, já que o objetivo delas é representar a variabilidade genética máxima possível presente na espécie. Considerando somente MLGs a variação genética dentro dos BAGs aumentou para 93,2%.

[.] alelo fixado, análise não realizada.

Nos contrastes entre BAGs observa-se que a variação entre IAC e ESALQ foi de apenas 3%, enquanto Embrapa apresentou variação de aproximadamente 31% da ESALQ e 18% do IAC. Os BAG IAC e ESALQ por compartilharem acessos em comum, diferem acentuadamente do da Embrapa.

Tabela 8 – Estruturação genética de acessos e genótipos multi locos idênticos (MLGs) de alho (*Allium sativum* L.) dos bancos de germoplasma do IAC, ESALQ e Embrapa através da estimativa das estatísticas G (Nei, 1973: 1987) e AMOVA

| BAG | n | \mathbf{H}_{0} | $\mathbf{\hat{H}_{S}}$ | $\boldsymbol{\hat{H}_T}$ | Ĥ _T ' | \mathbf{D}_{ST} | D _{ST} ' | $\boldsymbol{\hat{G}_{ST}}$ | $\mathbf{\hat{G}_{ST}}$ | $\mathbf{F}_{\mathbf{ST}}$ | $\mathbf{\hat{G}_{IS}}$ |
|-------------------|-----|------------------|------------------------|--------------------------|------------------|----------------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|
| MLG | 65 | 0,517 | 0,546 | 0,573 | 0,586 | 0,027 | 0,040 | 0,046 | 0,068 | - | 0,053 |
| Acessos | 151 | 0,497 | 0,419 | 0,485 | 0,519 | 0,069 | 0,104 | 0,143 | 0,200 | - | -0,195 |
| Contrastes | | | | | | | | | | | |
| IAC vs. ESALQ | | | | | | | | | 0,035 | 0,021** | |
| ESALQ vs. Embrapa | | | | | | | | | 0,310 | 0,261** | |
| Embrapa vs. IAC | | | | | | | | | 0,187 | 0,186** | |

Notas: H_O , heterozigosidade observada; H_S , diversidade gênica média dos bancos de germoplasma; H_T , diversidade gênica total (H_T ' padronizada); D_{ST} , diversidade gênica média entre bancos de germoplasma (D_{ST} ' padronizada); G_{ST} , diversidade gênica nos bancos de germoplasma em relação à população total, análoga ao F_{ST} de Wright, 1931 (G_{ST} ' padronizada); G_{IS} , estimador de F_{IS} (Wright, 1931). A padronização permite que os valores apresentados independam do tamanho amostral. F_{ST} com respectiva significância foi calculado por AMOVA; **, significativo a 1% de probabilidade.

O valor de \hat{G}_{IS} de -0,195, para todos os acessos avaliados nos BAGs, indica excesso de heterozigotos. Em geral, o excesso de heterozigotos é comum a espécies de reprodução assexuada, como o alho (BALLOUX, 2004; com exemplos em ALBERTO et al., 2005; RUGGIERO; REUSCH; PROCACCINI, 2005; STOECKEL et al., 2006; BRUNDU et al., 2008). Diferentemente, na análise dos MLGs há um equilíbrio entre heterozigosidade observada e esperada (\hat{G}_{IS} de 0,053).

A relação entre os 65 MLGs identificados nos três BAGs foi avaliada através de três estratégias: (*i*) análise agrupamento hierárquico; (*ii*) análise Bayesiana através do programa STRUCTURE (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000); e (*iii*) análise de componentes principais (PCA). Os resultados entre as diferentes metodologias foram semelhantes, apoiando as discussões aqui apresentadas e hipóteses levantadas.

A relação entre os 65 MLGs foi verificada através de dendrograma construído a partir da matriz de distância genética de Rogers-W, pelo critério de agrupamento UPGMA, e comparada inicialmente com os resultados obtidos pelo programa STRUCTURE (Figura 8). O K

mais provável foi dois pelo método proposto por Evanno, Regnaut e Goudet (2005) (Figura 9). No entanto, como Pritchard, Stephens e Donnelly (2000) sugerem que o K seja escolhido de acordo com a interpretação biológica mais adequada, K igual a três foi incluído nas discussões, pela semelhança com os resultados da análise de agrupamentos.

Na construção do dendrograma foram detectados conflitos, resultando em 21 árvores possíveis e, por isso, o suporte estatístico para a maioria dos nós foi inferior a 50%. No entanto, o alto coeficiente de correlação cofenética (r) de 0,9328 e a coerência com os resultados obtidos pelo programa STRUCTURE validaram os agrupamentos apresentados.

Os MLGs foram agrupados em dois ramos externos, A e B, idênticos aos agrupamentos verde e vermelho do STRUCTURE, para K igual a dois (com *bootstrap* de 100%). O ramo superior (A ou verde) apresentou dois ramos internos: (*i*) o superior (A₁) agrupou MLGs de alho seminobres precoces, com exceção do acesso Peruano, seminobre intermediário, e (*i*) o inferior (A₂), MLGs de alho classificados com nobres ou vernalizados, maioria proveniente de BAGs americanos (variedades com as siglas DDR, RAI, UO, WE e RE).

Para K igual a três, o ramo interno inferior (A₂) foi ramificado em dois outros ramos, representados pelo STRUCTURE por barras azuis (superior) e verdes (inferior), o que pode indicar diversidade entre acessos nobres. Observa-se que no agrupamento verde os MLGs WE8407, WE10735 e 'MLG V' apresentaram genótipos misturados, indicados por barras com ambas as cores, verde e azul, e, portanto, podem representar acessos intermediários a estes agrupamentos.

O ramo externo B (vermelho) apresentou maior consistência em relação aos demais agrupamentos, sendo observado para K igual a dois e três e também por PCA (Figura 10). Entre estes MLGs estão presentes alhos seminobres classificados como precoces e intermediários, com predominância dos intermediários. A PCA foi realizada com os dois primeiros componente principais, que juntos representaram aproximadamente 76,6% da variação observada nos dados. Nesta análise, alhos nobres (tardios) e seminobres precoces não apresentaram nenhuma estruturação identificável.

Os agrupamentos obtidos em dendrograma, STRUCTURE e PCA permitiram a identificação da estruturação genética dos acessos de alho em pelo menos dois grupos principais, (*i*) seminobres precoces e nobres (tardios) e (*ii*) seminobres intermediários. Estes grupos foram também observados por Siqueira et al. (1985) utilizando marcadores isoenzimáticos, em que o

padrão "CJLB" foi observado para clones precoces e tardios e "DIKA" para clones intermediários. A grande maioria dos acessos utilizados por Siqueira et al. (1985) são comuns aos avaliados no presente trabalho, o que valida os resultados aqui apresentados.

Como o alho apresenta elevada plasticidade fenotípica e como o ciclo fenológico é altamente dependente de fotoperíodo e temperatura, podendo ser mais longo ou curto de acordo com a região, ano e época de plantio, pode haver divergências entre as classificações de acesso, principalmente em relação aos seminobres, precoces e intermediários, feita por instituições de pesquisa diferentes. Este fato justificaria o agrupamento de alguns acessos precoces com intermediários, detectados neste estudo.

Em análises de agrupamento de acessos de alho em BAG, a grande maioria dos autores relata a formação de grupos de acordo com o ciclo fenológico (alhos seminobre e nobre, com consistência de agrupamento para os seminobres intermediários) e/ou florescimento (morfologia do escapo floral ou umbela) utilizando caracteres agromorfológicos, isoenzimáticos e marcadores RAPD e AFLP (SIQUEIRA et al., 1985; POOLER; SIMON, 2003; BRADLEY; RIEGER; COLLINS, 1996; IPEK; SIMON, 2003; MOTA et al., 2004; VOLK et al., 2004; MOTA et al., 2006; PANTHEE et al., 2006; VIEIRA; NODARI, 2007; BUSO et al., 2008; MORALES et al., 2010). Sendo assim, os resultados apresentados não parecem ser um artifício específico do conjunto de dados analisados.

Apesar de ser quase impossível a correlação de uma característica morfológica ou fisiológica, principalmente se esta for quantitativa, a um pequeno número de locos SSR, é provável que estes agrupamentos reflitam diferenças na base genética. O ciclo fenológico, altamente influenciado por fotoperíodo e temperatura, está provavelmente fortemente associado à origem geográfica ou local de domesticação dos acessos (ROGERS, 1950; EKBERG; ERIKSSON; DORMLING; 1979; ELLSTRAND; ROOSE, 1987; SUDDIHIYAM; STEER; TURNER, 1992).

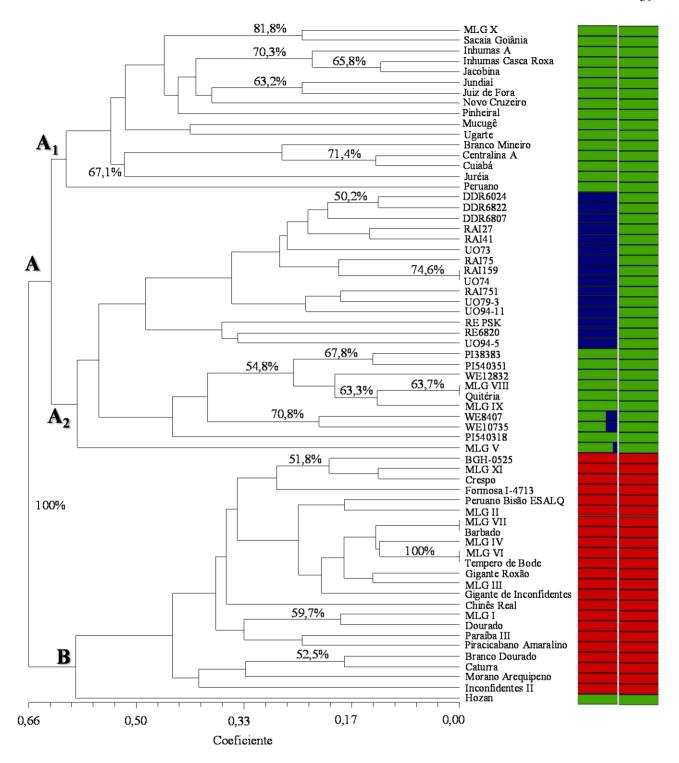


Figura 8 – Dendrograma construído a partir da matriz de distância genética de Rogers (1972) modificada por Wright (1978), através do critério de agrupamento UPGMA, para 65 genótipos multi locos idênticos de alho (*Allium sativum* L.) identificados nos bancos de germoplasma do IAC, ESALQ e Embrapa. O coeficiente de correlação cofenética é 0,9060. As barras laterais são referentes aos agrupamentos obtidos pelo programa STRUCTURE para K igual a dois e três. Valores de *bootstrap* inferior a 50% não apresentados

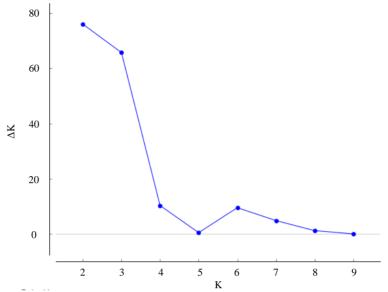


Figura 9 – Gráfico com a identificação do K mais provável pelo método *ad hoc* ΔK (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005) para estruturação genética de 65 genótipos multi locos idênticos de alho (*Allium sativum* L.) pelo STRUCTURE

Agrupamentos relacionado à origem geográfica em alho foram relatados somente recentemente por Zhao et al. (2011), utilizando marcadores SSR, com a formação de dois ramos distintos: (i) Rússia, Nepal, China e Coreia do Sul e (ii) Uzbequistão, EUA e Rússia. Estes acessos são de regiões estabelecidas como centro de origem primário e secundário, com exceção dos EUA, e os sítios de coleta devem estar documentados com precisão.

A falta de informações sobre os sítios de coleta (original) impossibilita a correlação dos agrupamentos com a origem geográfica, mas existem outros motivos que inviabilizam está correlação em bancos de germoplasma brasileiros, são eles: (i) cultivares com mesma origem geográfica introduzidas separadamente na mesma região com nomes diferentes; (ii) tendência a nomear acessos localmente de acordo com características morfológicas; (iii) exposição da mesma cultivar a pressão seletiva diferencial em condições ambientais distintas ou acúmulo de mutações somáticas devido a cultivos prolongados (muitas cultivares foram e continuam sendo plantadas por séculos na mesma região e acabam por acumular mutações diferentes de seus clones mantidos em outras regiões); ou (iv) intercâmbio de materiais genéticos distintos

entre países sem informação do sítio de coleta original (BRADLEY; RIEGER; COLLINS, 1996; MOTA et al. 2004; PANTHEE et al., 2006).

A caracterização de bancos de germoplasma de alho utilizando marcadores SSR é inédita no Brasil. Os agrupamentos de acessos apresentados confirmaram os resultados obtidos com marcadores agromorfológicos, isoenzimáticos, RAPD e AFLP. Os acessos seminobres precoces e intermediários destacam-se por apresentar provável diferença na base genética. Esta informação poderá ser utilizada em futuros programas de melhoramento, já que esta classe de alho apresenta boa produtividade e rusticidade, característica importante já que a alhicultura é feita em grande parte por pequenos agricultores no país.

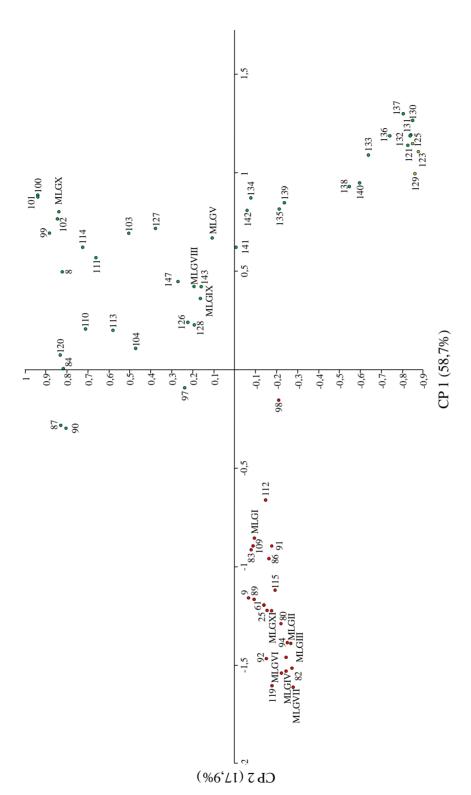


Figura 10 - Análise de componentes principais da matriz de distância genética de Rogers (1972) modificada por Wright (1978) de 65 genótipos multi locos idênticos de alho (Allium sativum L.) identificados nos bancos de germoplasma do IAC, ESALQ e Embrapa; pontos vermelhos e verdes são referentes aos grupos obtidos pelo programa STRUCTURE para K igual a 2

Nota: Vide Anexo A e B para identificação dos acessos e Tabela 4 para identificação dos acessos referentes aos genótipos multi locos idênticos

5 CONCLUSÕES

- A biblioteca genômica enriquecida com SSR permitiu o isolamento de motivos di e trinucleotídeos de interesse para o desenvolvimento de iniciadores SSR.
- No total foram desenvolvidos 16 locos SSR inéditos para alho, 10 polimórficos; moderado a altamente informativos, qualidade imprescindível para uso em estudos de diversidade, mapeamento genético e futuramente em programas de melhoramento genético da espécie.
- Os 151 acessos de alho foram genotipados com 17 locos SSR polimórficos, permitindo a identificação de 65 genótipos multi locos idênticos.
- As coleções nucleares estabelecidas apresentaram reduzido número de acessos e máxima diversidade genética.
- A variabilidade genética dos bancos de germoplasma de alho é alta, considerando a propagação vegetativa e apomixia presente na espécie.
- Os bancos de germoplasma do IAC e Embrapa apresentaram destaque pela presença de alelos privados e maior número de MLGs.
- Acessos de alhos classificados como seminobres, de ciclo fenológico precoce e intermediário, foram divididos em dois grupos bem distintos. Alhos precoces foram geneticamente mais próximos de alhos nobres, e ambos foram igualmente distantes dos seminobres, intermediários.

REFERÊNCIAS

ABOUL-ENEIN, B.H.; ABOUL-ENEIN, F.H. *Allium sativum*: nutritional properties. **Clinical nutrition**, Kidliton, v. 24, n. 6, p. 1111-1112, 2005.

AGARWAL. K.C. Therapeutic actions of garlic constituents. **Medicinal Research Reviews**, New York, v. 16, n. 1, p. 111-124, 1996.

ALBERTO, F.; GOUVEIA, L.; ARNAUD-HAOND, S.; PÉREZ-LLORÉNS, J.L.; DUARTE, C.M.; SERRÃO, E.A. Within population spatial genetic structure, neighbourhood size and clonal subrange in the seagrass *Cymodocea nodosa*. **Molecular Ecology**, Malden, v. 14, p. 2669-2681, 2005.

ALI, M.; THOMSON, M.; AFZAL, M. Garlic and onions: their effect on eicosanoid metabolism and its clinical relevance. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids**, New York, v. 62, n. 2, p.55-73, 2000.

ALLARD, R.W. **Princípios do melhoramento genético de plantas**. Rio de Janeiro: USAID, 1971. 331p.

AL-ZAHIM, M.; NEWBURY, H.J.; FORD-LLOYD, B.V. Classification of genetic variation in garlic (*Allium sativum* L.) revealed by RAPD. **HortScience**, Alexandria, v. 32, n. 6, p. 1102-1104, 1997.

ARIGA, T.; SEKI, T. Antithrombotic and anticancer effects of garlic-derived sulfur compounds: a review. **BioFactors**, Malden, v. 26, p. 93-103, 2006.

ARNAUD-HAOND, S.; BELKHIR, K. GENCLONE: a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 7, p. 15-17, 2007.

ARZANLOU, M.; BOHLOOLI, S. Introducing of green garlic plant as a new source of allicin. **Food Chemistry**, London, v. 120, p. 179-183, 2010.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES DE ALHO. **Nosso alho.** 2. ed. Brasília, 2009. 47 p.

BAGHALIAN, K.; ZIAIB, S.A.; NAGHAVIC, M.R.; BADIB, H.N.; KHALIGHIA, A. Evaluation of allicin content and botanical traits in Iranian garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 103, p. 155-166, 2005.

BALLOUX, F. Heterozygote excess in small populations and the heterozygote-excess effective population size. **Evolution**, Malden, v. 58, p. 1891-1900, 2004.

BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 155-165, 2002.

BANDYOPADHYAY, S.; ROY, A.; DAS, S. Binding of garlic (*Allium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of homopteran pests is correlated to its insecticidal activity. **Plant Science**, Limerick, v. 161, p. 1025-1033, 2001.

BANERJEE, S.K.; MUKHERJEE, P.K.; MAULIK, S.K. Garlic as an antioxidant: the good, the bad and the ugly. **Phytotherapy research**, London, v. 17, p. 97-106, 2003.

BEATTY, G.M.; MCEVOY, P.M.; SWEENEY, O.; PROVAN, J. Range-edge effects promote clonal growth in peripheral populations of the one-sided wintergreen *Orthilia secunda*. **Diversity and Distributions**, Oxford, v. 14, p. 546-555, 2008.

BILLOTE, N.; LAGODA, P.J.L.; RISTERUCCI, A.; BAURENS, F. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, Paris, v. 54, p. 277-288, 1999.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNIEK, M.; DAVIS, R.V. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 32, p. 314-331, 1980.

BOWCOCK, A.M.; RUIZ LINARES, A.; TOMFOHRDE, J.; MINCH, E.; KIDD, J.R.; CAVALLI-SFORZA, L.L. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. **Nature**, London, v. 368, p. 455-457, 1994.

BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SAMOJLIK, I.; GORAN, A.; IGIC, R. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). **Food Chemistry**, London, v. 111, p. 925-929, 2008.

BOZZINI, A. Discovery of an Italian fertile tetraploid line of garlic. **Economic Botany**, Bronx, v. 45, n. 3, p. 436-438, 1991.

BRADLEY, K.F.; RIEGER, M.A.; COLLINS, G.G. Classification of Australian garlic cultivars by DNA fingerprinting. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 36, p. 613-618, 1996.

BRANDOLINI, V.; TEDESCHI, P.; CERETI, E.; MAIETTI, A.; BARILE, D.; COÏSSON, J.D.; MAZZOTTA, D.; ARLORIO, M.; MARTELLI, A. Chemical and genomic combined approach applied to the characterization and identification of Italian *Allium sativum* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 678-683, 2005.

BRESLAUER, K.J.; RONALD, F.; BLOCKER, H.; MARKY, L.A. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. Washington, v. 83, n. 11, p. 3746-3750, 1986.

BREWSTER, J.L. **Onions and other vegetable Alliums**. 2nd ed. Wallingford: CAB International, 2008. 432 p.

BRUNDU, G.A.D.; LUPI, R.; ZAPELLI, I.; FOSSATI, T.; PATRIGNANI, G.; CAMARDA, I.; SALA, F.; CASTIGLIONE, S. The origin of clonal diversity and structure of *Populus alba* in Sardinia: evidence from nuclear and plastid microsatellite markers. **Annals of Botany**, Oxford, v. 102, p. 997-1006, 2008.

BURBA, J.L. Obtención de nuevas variedades de ajo. In: BORGO, R.; PICCOLO, R.; LIPINSKI, V.; MILLÁN, N. (Ed.). **Tercer Curso Taller sobre Producción, Comercialización e Industrialización de Ajo**. Mendoza: INTA, EEA, 1993. p. 45-48.

BUSCHIAZZO, E.; GEMMELL, N.J. The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. **BioEssays**, Cambridge, v. 28, p. 1040-1050, 2006.

BUSO, G.S.C.; PAIVA, M.R.; TORRES, A.C.; RESENDE, F.V.; FERREIRA, M.A.; BUSO, J.A.; DUSI, A.N. Genetic diversity studies of Brazilian garlic cultivars and quality control of garlic-clover production. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 7, n. 2, p. 534-541, 2008.

CALABRESE, P.P.; DURRETT, R.T.; AQUADRO, C.F. Dynamics of microsatellite divergence under stepwise mutation and proportional slippage/point mutation models. **Genetics**, Austin, v. 159, p. 839-852, 2001.

CHIAM, W.Y.; HUANG, Y.; CHEN, S.X.; HO, S.H. Toxic and antifeedant effects of allyl disulfide on *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 92, p. 239-245, 1999.

CHO, R.J.; MINDRINOS, M.; RICHARDS, D.R.; SAPOLSKY, R.J.; ANDERSON, M.; DRENKARD, E.; DEWDNEY, J.; REUBER, T.L.; STAMMERS, M.; FEDERSPIEL, N.; THEOLOGIS, A.; YANG, W.H.; HUBBELL, E.; AU, M.; CHUNG, E.Y.; LASHKARI, D.; LEMIEUX, B.; DEAN, C.; LIPSHUTZ, R.J.; AUSUBEL, F.M.; DAVIS, R.W.; OEFNER, P.J. Genome-wide mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Genetics**, New York, v. 23, n. 2, p. 203-207, 1999.

CRUZ, C.D. Programa Genes: análise multivariada e simulação. Viçosa: UFV, 2006. 175 p.

CURTIS, H.; NOLL, U.; STORMANN, J.; SLUSARENKO, A. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 65, p. 79-89, 2004.

DEKA, R.; JIN, L.; SHRIVER, M.D.; YU, L.M.; DECROO, S.; HUNDRIESER, J.; BUNKER, C.H.; FERRELL, R.E.; CHAKRABORTY, R. Population genetics of dinucleotide (dC-dA)n(dG-dT) polymorphisms in world populations. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 56, p. 461-474, 1995.

DIERINGER, D.; SCHLÖTTERER, C. Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 3, p. 167-169, 2003.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, p. 13-15, 1990.

DUTECH, C.; AMSELLEM, L.; BILLOTTE, N.; JARNE, P. Characterization of (GA)n microsatellite loci using an enrichment protocol in the neotropical tree species *Vouacapoua americana*. **Molecular Ecology**, Malden, v. 9, p. 1433-1449, 2000.

EARL, D.A. **Structure Harvester** v.0.6.5. 2011. Disponível em: http://users.soe.ucsc.edu/~dearl/software/struct harvest>. Acesso em: 14 mar. 2011.

EKBERG, I.; ERIKSSON, G.; DORMLING, I. Photoperiodic reactions in conifer species. **Holarctic Ecology**, Waterloo, v. 2, n. 4, p. 255-263, 1979.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 5, p. 435-445, 2004.

ELLSTRAND, N.C.; ROOSE, M.L. Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. **American Journal of Botany**, St Louis, v. 74, n. 1, p. 123-131, 1987.

EL MOUSADIK A.; PETIT R.J. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree (*Argania spinosa* L. Skeels) endemic to Marocco. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 92, p. 832-839, 1996.

ERNST, E. Editorial. **Molecular Nutrition and Food Research**, Weinheim, v. 51, p. 1317, 2007.

ETOH, T.; OGURA, H. Multivalent chromosomes in garlic, *Allium sativum* L. **Memoirs of Faculty of Agriculture Kagoshima University**, Kagoshima, v. 14, p. 53-59, 1977.

ETOH, T.; SIMON, P.W. Diversity, fertility and seed production of garlic. In: RABINOWITCH, H.D.; CURRAH, L. (Ed.). *Allium* crop science: recent advances. Wallingford: CAB International, 2002. p. 101-114.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, p. 611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs perform population genetics analysis under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, Malden, v. 10, p. 564-567, 2010.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Bethesda, v. 131, p. 479-491, 1992.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics**, Austin, v. 164, p. 1567-1587, 2003.

FIGLIUOLO, G.; DI STEFANO, D. Is single bulb producing garlic *Allium sativum* or *Allium ampeloprasum*? **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 114, p. 243-249, 2007.

FLINT, H.M.; PARKS, N.J.; HOLMES, J.E.; JONES, J.A.; HIGUERA, C.M. Tests of garlic oil for the control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolia* Bellows and Perring (Homoptera: Aleyrodidae) in cotton. **Southwestern Entomologist**, Weslaco, v. 20, p. 137-150, 1995.

FUTUYMA, D. Evolution. Sunderland: Sinauer, 2006. 603 p.

GARCÍA-GONZÁLEZ, R.; LÓPEZ, S.; FERNÁNDEZ, M.; BODAS, R.; GONZÁLEZ, J. Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminal methane production in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 147, p. 36-52, 2008.

GARCÍA LAMPASONA, S.; MARTÍNEZ, L.; BURBA, J. L. Genetic diversity among selected Argentineam garlic clones (*Allium sativum* L.) using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). **Euphytica**, Wageningen, v. 132, n. 1, p. 115-119, 2003.

GOLDSTEIN, D.B.; POLLOCK, D.D. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. **Journal of Heredity**, Washington, v. 88, n. 5, p. 335-342, 1997.

GOUDET, J. FSTAT version 1.2: a computer program to calculate F statistics. **Journal of Heredity**, Washington, v. 86, n. 6, p. 485-486, 1995.

GOUESNARD, B.; BATAILLON, T.M.; DECOUX, G.; ROZALE, C.; SCHOEN, D.J.; DAVID, J.L. MSTRAT: An algorithm for building germplasm core collections by maximizing allelic or phenotypic richness. **Journal of Heredity**, Washington, v. 92, p. 93-94, 2001.

GUO, X.; ELSTON, R.C. Linkage information content of polymorphic genetic markers. **Human Heredity**, Basel, v. 49, n. 2, p. 112-118, 1999.

GURUSUBRAMANIAN, G.; KRISHNA, S.S. The effects of exposing eggs of four cotton insect pests to volatiles of *Allium sativum* (Liliaceae). **Bulletin of Entomological Research**, Farnhan Royal, v. 86, p. 29-31, 1996.

HALL, T.A. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposiums Series**, Oxford, n. 41, p. 95-98, 1999.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. Past: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Eletronica**, Boulder, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.

HAMON, S.; DUSSERT, S.; NOIROT, M.; ANTHONY, F.; HODGKIN, T. Core collections: accomplishments and challenges. **Plant Breeding Abstracts**, Farnhan Royal, v. 65, n. 8, p. 1125-1133, 1995.

HAVEY, M.J.; McCALLUM, J.; TOWN, C.D.; JAKSE, J.; SHIGYO, M. The potencial impact of genomes for Allium crop improvement. **Acta Horticulturae**, n. 770, p. 139-146, 2008. Disponível em: http://www.actahort.org/books/770/770_15.htm Acesso em: 10 mar. 2011.

HOLSINGER, K.E.; WEIR, B.S. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} . **Nature Reviews Genetics**, London, v. 10, p. 639-650, 2009.

HONG, C.-J.; WATANABE, H.; ETOH, T.; IWAI, S. Morphological and karyological comparison of garlic clones between the center of origin and the Westernmost area of distribution. **Memoirs of Faculty of Agriculture Kagoshima University**, Kagoshima, v. 36, p. 1-10, 2000.

HOOGERHEIDE, E.S.S. Divergência genética entre acessos de alho avaliados em ambientes distintos baseada em variáveis quantitativas e qualitativas. 2009. 118 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

HURLBERT, S.H. The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. **Ecology**, Tempe, v. 52, p. 577-586, 1971

IPEK, M.; IPEK, A.; SIMON, P.W. Comparison of AFLPs, RAPD markers, and isozymes for diversity assessment of garlic and detection of putative duplicates in germplasm collections. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, Alexandria, v. 128, n. 2, p. 246-252, 2003.

_____. Molecular characterization of Kastamonu garlic: an economically important garlic clone in Turkey. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 115, n. 2, p. 203-208, 2008a.

_____. Rapid characterization of garlic clones with locus-specific DNA markers. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 32, p. 357-362, 2008b.

IPEK, M.; IPEK, E.A.; ALMQUIST, E.S.G.; SIMON, E.P.W. Demonstration of linkage and development of the first low-density genetic map of garlic, based on AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 110, p. 228-236, 2005.

JARIAL, M.S. Toxic effect of garlic extracts on the eggs of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): a scanning electron microscopic study. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 38, p. 446-450, 2001.

JARNE, P.; LAGODA, P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 11, p. 424-430, 1996.

KALINOWSKI, S.T. Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling designs. **Conservation Genetics**, v. 5, p. 539-543, 2004.

KENEL, F.; EADY, C.; BRINCH, S. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and regeneration of garlic (*Allium sativum*) immature leaf tissue. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 29, p. 223-230, 2010.

KIM, A.; KIM, R.N.; KIM, D.-W.; CHOI, S.-H.; KANG, A.; NAM, S.-H.; PARK, H.-S. Identification of a novel garlic cellulase gene. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 28, p. 388-393, 2010.

KIM, D.-W.; JUNG, T.-S.; NAM, S.-H.; KWON, H.-R.; KIM, A.; CHAE, S.-H.; CHOI, S.-H.; KIM, D.-W.; KIM, R.N.; PARK, H.-S. GarlicESTdb: an online database and mining tool for garlic EST sequences. **BMC Plant Biology**, London, v. 9, p. 61-66, 2009.

KIMURA, M.; CROW, J.F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**, Austin, v. 49, p. 725-738, 1964.

KIMURA, M.; OHTA, T. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 75, n. 6, p. 2868-2872, 1978.

KREBS, C.J. Ecological methodology. New York: Harper & Row, 1989. 620 p.

LATHA, P.; ANAND, T.; RAGUPATHI, N.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani*. **Biological Control**, Orlando, v. 50, p. 85-93, 2009.

LEE, H.-R.; EOM, E.-M.; LIM, Y.-P; BANG, J.-W.; LEE, D.-H. Construction of a garlic BAC library and chromosomal assignment of BAC clones using the FISH technique. **Genome**, Ottawa, v. 46, p. 514-520, 2003.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis:** computer program for the analysis of allelic data; version 1.0 (d16c). Disponível em: http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/software.html>. Acesso em: 10 fev. 2009.

LEWONTIN, R.C.; HUBBY, J.L. A molecular approach to the study of gene heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. **Genetics**, Austin, v. 54, p. 595-609, 1966.

LISBÃO, R.S.; SIQUEIRA, W.J.; FORNASIER, J.B.; TRANI, P.E. Alho. In: FURLANI, A.M.C.; VIÉGAS, G.P. (Ed.). **O melhoramento de plantas no Instituto Agronômico**. Campinas: Instituto Agronômico, 1993. v. 1, p. 222-253.

LUCINI, M.A. **O alho no Brasil:** um pouco da história dos números do nobre roxo. Curitibanos: [s. n.], 2008. Disponível em:

http://www.anapa.com.br/principal/images/stories/documentos/cultura_do_alho_no_brasil_final.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2011.

_____. **Alho safra 2010/2011**. Curitibanos: [s. n.], 2010. 25 p.

MA, K.-H.; KWAG, J.-G.; ZHAO, W.; DIXIT, A.; LEE, G.-A., KIM, H.-H., CHUNG, I.-M., KIM, N.-S.; LEE, J.-S., JI, J.-J.; KIM, T.-S.; PARK, Y.-J. Isolation and characteristics of eight novel polymorphic microsatellite loci from the genome of garlic (*Allium sativum* L.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 122, n. 3, p. 355-361, 2009.

MAAB, H.I.; KLAAS, M. Intraspecific differentiation of garlic (*Allium sativum* L.) by isozyme and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 91, n. 1, p. 89-97, 1995.

MACHIAL, C.M.; SHIKANO, I.; SMIRLE, M.; BRADBURY, R.; ISMAN, M.B. Evaluation of the toxicity of 17 essential oils against *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae) and *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 66, p. 1116-1121, 2010.

MARTINS, W.S.; LUCAS, D.C.S.; NEVES, K.F.S.; BERTIOLI, D.J. WebSat: a web software for microsatellite marker development. **Bioinformation**, v. 3, n. 6, p. 282-283, 2009. Disponível em: http://wsmartins.net/websat Acesso em: 15 mar 2009.

MATUS, I.; GONZÁLEZ, M.I.; POZO, A. Evaluation of phenotipyc variation in a Chilean collection of garlic (*Allium sativum* L.) clones using multivariate analysis. **Plant Genetic Resources Newletter**, Maccarese, n. 117, p. 31-36, 1999.

MELO, A.S. O que ganhamos 'confundindo' riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade? **Biota Neotropica**, Campinas, v. 8, n. 3, p. 21-27, 2008.

MILLER, M.P. **TFPGA**: tools for population genetic analyses; version 1.3. Flagstaff: Northern Arizona University, 1997. 30 p.

MORALES, R.G.F.; RESENDE, J.T.V.; SILVA, P.R.; DELATORRE, C.A.; RESENDE, F.V.; FIGUEIREDO, A.S.T. Identificação de cultivares de alho por marcadores AFLP. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 28, p. S195-S199, 2010.

MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWELL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, New York, v. 30, p. 194-200, 2002.

MOTA, J.H.; SOUZA, R.J.; YURI, J.E.; RESENDE, G.M.; PAIVA, L.V. Diversidade genética de cultivares de alho (*Allium sativum* L.) por meio de marcador molecular RAPD. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 764-770, 2004.

MOTA, J.H.; SOUZA, R.J.; YURI, J.E.; REZENDE, G.M.; TEIXEIRA, I.R. Similaridade morfológica de cultivares de alho (*Allium sativum* L.). **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, Garça, n. 8, 2005. Disponível em: http://www.revista.inf.br/agro08/artigos/artigo02.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2010.

MOTA, J.H.; YURI, J.E.; RESENDE, G.M.; SOUZA, R.J. Similaridade genética de cultivares de alho pela comparação de caracteres morfológicos, físico-químicos, produtivos e moleculares. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 156-160, 2006.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.

_____. Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia University, 1987. 512 p.

OLIVEIRA, E.J. Desenvolvimento e uso de marcadores microssatélites para construção e integração de mapas genéticos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. flavicarpa Deg.). 2006. 152 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

OLIVEIRA, F.L.; DORIA, H.; TEODORO, R.B.; RESENDE, F.V. Características agronômicas de cultivares de alho em Diamantina. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 355-359, 2010.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

OHRI, D.; FRITSCH, R.M.; HANELT, P. Evolution of genome size in *Allium* (Alliaceae). **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 210, p. 57-86, 1998.

ORTIZ, C.M.; BATISTA, C.E.A.; SOUZA, A.P.; PINHEIRO, J.B.; ZUCCHI, M.I. Construção de bibliotecas enriquecidas com locos microssatélites para alho (*Allium sativum*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 53., 2007, Águas de Lindóia. **Resumos...** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2007. v. 1., p. 270.

PANTHEE, D.R.; KC, R.B.; REGMI, H.N.; SUBEDI, P.P.; BHATTARAI, S.; DHAKAL, J. Diversity analysis of garlic (*Allium sativum* L.) germplasms available in Nepal based on morphological characters. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 53, p. 205-212, 2006.

PARK, S.D.E. Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection. 2001. Thesis (PhD) – University of Dublin, Dublin, 2001.

PATRA, A.K.; KAMRA, D.N.; AGARWAL, N. Effect of spices on rumen fermentation, methanogenesis and protozoa counts in in vitro gas production test. **International Congress Series**, Amsterdam, v. 1293, p. 176-179, 2006.

PEAKALL, R.; GILMORE, S.; KEYS, W.; MORGANTE, M.; RAFALSKI, A. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 15, p. 1275-1287, 1998.

POLICRITI, A.; SGARRO, A. **CoreFinder v.1.0d**. 2011. Disponível em: http://www.appliedgenomics.org/services/software. Acesso em: 14 mar. 2011.

POOLER, M.R.; SIMON, P.W. Characterization and classification of isozyme and morphological variation in a diverse collection of garlic clones. **Euphytica**, Wageningen, v. 68, p. 121-130, 1993.

PRIMMER, C.R.; ELLEGREN, H.; SAINO, N.; MOLLER, A.P. Directional evolution in germline microsatellite mutations. **Nature Genetics**, New York, v. 13, p. 391-393, 1996.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Austin, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

PROWSE, G.M.; GALLOWAY, T.S.; FOGGO, A. Insecticidal activity of garlic juice in two dipteran pests. **Agricultural and Forest Entomology**, Malden, v. 8, p. 1-6, 2006.

QUEIROZ, Y.S.; ISHIMOTO, E.Y.; BASTOS, D.H.M.; SAMPAIO, G.R.; TORRES, E.A.F.S. Garlic (*Allium sativum* L.) and ready-to-eat garlic products: in vitro antioxidant activity. **Food Chemistry**, London, v. 115, p. 371-374, 2009.

REDDY, K.; REDDY, C.; MURALIDHARAN, K. Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* infecting rice grains. **Food Control**, Guildford, v. 20, p. 173-178, 2009.

REYNOLDS, J.; WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. **Genetics**, Austin, v. 105, p. 767-779, 1983.

ROGERS, J.S. The inheritance of photoperiodic response and tillering in maize-teosinte hybrids. **Genetics**, Austin, v. 35, p. 513-540, 1950.

_____. **Measures of genetic similarity and genetic distance.** Austin: University of Texas, 1972. (Studies in Genetics, 7).

ROHLF, F.J. **NTSYS-pc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system; version 2.1. New York: Exeter, 2000. 98 p.

ROTEM, N.; SHEMESH, E.; PERETZ, Y.; AKAD, F.; EDELBAUM, O.; RABINOWITCH, H.D.; SELA, I.; KAMENETSKY, R. Reproductive development and phenotypic differences in garlic are associated with expression and splicing of LEAFY homologue gaLFY. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 5, p. 1133-1141, 2007.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primmer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: MISENER, S.; KRAWETZ, S.A. (Ed.). **Bioinformatics**: methods and protocols. Totowa: Humana, 1999. p. 365-386. (Methods in Molecular Biology, 132).

RUGGIERO, M.V.; REUSCH, T.B.H.; PROCACCINI, G. Local genetic structure in a clonal dioecious angiosperm. **Molecular Ecology**, Malden, v. 14, p. 957-967, 2005.

SADEGHI, A.; SMAGGHE, G.; BROEDERS, S.; HERNALSTEENS, J.-P.; GREVE, H.D.; PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Ectopically expressed leaf and bulb lectins from garlic (*Allium sativum* L.) protect transgenic tobacco plants against cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*). **Transgenic Research**, London, v. 17, p. 9-18, 2008.

SAHA, P.; DASGUPTA, I.; DAS, S. A novel approach for developing resistance in rice against phloem limited viruses by antagonizing the phloem feeding hemipteran vectors. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 62, p. 735-752, 2006.

SANGUINETTI, C.J.; DIAS NERO, E.; SIMPSON, A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, Natick, v. 17, p. 915-919, 1994.

SAWAHEL, W.A. Stable genetic transformation of garlic plants using particle bombardment. **Cellular and Molecular Biology Letters**, Wroclaw, v. 7, p. 49-59, 2002.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers: just a matter of fashion? **Nature**, London, v. 5, p. 63-69, 2004.

SCHWARZACHER, T. DNA, chromosomes, and in situ hybridization. **Genome**, Ottawa, v. 46, p. 953-962, 2003.

SENGUPTA, S.; CHAKRABORTI, D.; MONDAL, H.A.; DAS, S. Selectable antibiotic resistance marker gene-free transgenic rice harbouring the garlic leaf lectin gene exhibits resistance to sap-sucking planthoppers. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 29, p. 261-271, 2010.

SHANNON, C. E.; WEAVER, W. **The mathematical theory of communication**. Urbana: University of Illinois, 1949. 117 p.

SIMON, P.W.; JENDEREK, M.M. Flowering, seed production and the genesis of garlic breeding. **Plant Breeding Reviews**, Westport, v. 23, p. 211-244, 2003.

SINGH, R.J; LEBEDA, A. Landmark research in vegetable crops. In: SINGH, R.J. (Ed.). **Genetic resources, chromosome, engineering, and crop improvement**. Boca Raton: CRC Press, 2007. p. 1-16. (Vegetable Crops, 3).

SIQUEIRA, W.J.; TAVARES, M.; TRANI, P.E. Variedades de alho para o Estado de São Paulo. Campinas: IAC, 1996. 26 p. (IAC. Boletim Técnico, 165).

SIQUEIRA, W.J.; MEDINA FILHO, H.P.; LISBÃO, R.S.; FORNASIER, J.B. Caracterização isoenzimática e morfológica de clones e introduções de alho. **Bragantia**, Campinas, v. 44, n. 1, p. 357-374, 1985.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, Austin, v. 139, p. 457-462, 1995.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy:** the principles and practice of numerical classification. São Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573 p.

SOKAL, R.R.; MICHENER, C.D. A statistical method for evaluating systematic relationships. **University of Kansas Science Bulletin**, Lawrence, v. 38, p. 1409-1438, 1958.

STOECKEL, S.; GRANGE, J.; FERNÁNDEZ-MANJARRES, J.F.; BILGER, I.; FRASCARIA-LACOSTE, N.; MARIETTE, S. Heterozygote excess in a self-incompatible and partially clonal forest tree species *Prunus avium* L. **Molecular Ecology**, Malden, v. 15, n. 8, p. 2109-2118, 2006.

STRAUSS, L.L.; PINO, J.A.; COHEN, J.L. Quantification of diversity in ex-situ plant collections. **Diversity**, Bethesda, v. 16, p. 30-32, 1988.

SUDDIHIYAM, P.; STEER, B.T.; TURNER, D.W. The flowering of sesame (*Sesamum indicum* L.) in response to temperature and photoperiod. **Australian Journal of Agricultural Research,** Victoria, v. 43, p. 1101-1116, 1992.

TAJIMA, F. Infinite-allele model and infinite-site model in population genetics. **Journal of Genetics**, Bangalore, v. 75, n. 1, p. 27-31, 1996.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA marker. **Nucleic Acid Research**, Oxford, v. 17, p. 6463-6471, 1989.

TRANI, P.E.; PASSOS, F.A.; FOLTRAN, D.E.; TIVELLI, S.W.; RIBEIRO, I.J.A. Avaliação dos acessos de alho pertencentes à coleção do Instituto Agronômico de Campinas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 935-939, 2005.

TRANI, P.E.; TAVARES, M.; SIQUEIRA, W.J.; SANTOS, R.R.; BISÃO, L.G.; LISBÃO, R.S. **Cultura do alho recomendações para seu cultivo no Estado de São Paulo.** Campinas: IAC, 1997. 39 p. (IAC. Boletim Técnico, 170).

VIEIRA, R.L.; NODARI, R.O. Diversidade genética de cultivares de alho avaliado por marcadores RAPD. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 1, p. 51-57, 2007.

VOLK, G.M.; HENK, A.D.; RICHARDS, C.M. Genetic diversity among U.S. garlic clones as detected using AFLP methods. **Journal of American Society of Horticultural Sciences**, Alexandria, v. 129, n. 4, p. 559-569, 2004.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WEBER, J.L. Informativeness of human (dC-dA)n (dG-dT)n polymorphisms. **Genomics**, San Diego, v. 7, n. 4, p. 524-530, 1990.

WEBER, Z.; MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 44, p. 388-396, 1989.

WILLIAMS, J.C.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. Genetics, Austin, v. 16, p. 97-159, 1931.

_____. **Evolution and the genetics populations**: variability within and among natural populations. Chicago: University of Chicago, 1978. 573 p.

XIA, L.; NG, T.B. Isolation of alliumin, a novel protein with antimicrobial and antiproliferative activities from multiple-cloved garlic bulbs. **Peptides**, New York, v. 26, p. 177-183, 2005.

YU, J.-W.; DIXIT, A.; MA, K.-H.; CHUNG, J.-W.; PARK, Y.-J. A study on relative abundance, composition and length variation of microsatellites in 18 underutilized crop species. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 56, n. 2, p. 237-246, 2009.

YÜZBASIOGLU, D.; ÜNAL, F. Karyotyping, C- and nor banding of *Allium sativum* L. (Liliaceae) cultivated in Turkey. **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 36, n. 2, p. 343-349, 2004.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, Malden, v. 11, p. 11-16, 2002.

ZEWDIE, Y.; HAVEY, M.J.; PRINCE, J.P.; JENDEREK, M.M. The first genetic linkages among expressed regions of the garlic genome. **Journal of the American Society for Horticultural Sciences**, Alexandria, v. 130, n. 4, p. 569-574, 2005.

ZHAO, W.-G.; CHUNG, J.-W.; LEE, G.-A.; MA, K.-H.; KIM, H.-H.; KIM, K.-T.; CHUNG, I.-M.; LEE, J.-K.; KIM, N.-S.; KIM, S.-M.; PARK, Y.-J. Molecular genetic diversity and population structure of a selected core set in garlic and its relatives using novel SSR markers. **Plant Breeding**, Berlin, v. 130, p. 46-54, 2011.

ZHENG, S.-J.; HENKEN, B.; AHN, Y.K.; KRENS, F.A.; KIK, C. The development of a reproducible *Agrobacterium tumefaciens* transformation system for garlic (*Allium sativum* L.) and the production of transgenic garlic resistant to beet armyworm (*Spodoptera exigua* Hübner). **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 14, p. 293-307, 2004.

ANEXOS

ANEXO A – Acessos de alho ($Allium\ sativum\ L$.) do banco de germoplasma do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e do Departamento de Genética, ESALQ/USP

(continua)

| | | | (continua |
|--------|--------------------------|-----|------------------|
| Nº Id. | Acesso | BAG | Ciclo fenológico |
| 1 | Canela de Ema | IAC | Precoce |
| 2 | Cará | IAC | Precoce |
| 3 | Mineiro | IAC | Precoce |
| 4 | Gravatá A | IAC | Precoce |
| 5 | Do Reino I-2118 (Araras) | IAC | Precoce |
| 6 | Mossoró | IAC | Precoce |
| 7 | Santa Catarina Branco | IAC | Precoce |
| 8 | Sacaia de Goiânia - CNPH | IAC | Precoce |
| 9 | BGH-0525 | IAC | - |
| 10 | BGH-4823 | IAC | - |
| 11 | Roxo de Araras | IAC | - |
| 12 | Andradas Manoel Lopez | IAC | - |
| 13 | Assaí I-3703 | IAC | Intermediário |
| 14 | Piedade | IAC | Intermediário |
| 15 | Santa Catarina Roxo | IAC | Intermediário |
| 16 | Chinês I-4653 | IAC | Intermediário |
| 17 | Roxinho I-5063 | IAC | Intermediário |
| 18 | Peruano Bisão | IAC | - |
| 19 | Amarante - CNPH | IAC | Intermediário |
| 20 | Mexicano Br | IAC | - |
| 21 | Roxo Capim Branco I-3969 | IAC | Intermediário |
| 22 | Cateto Precoce I-1634 | IAC | - |
| 23 | Alho Bepe | IAC | - |
| 24 | Lavínia I-3208 | IAC | Intermediário |
| 25 | Formosa I-4713 | IAC | Intermediário |
| 26 | Lavínia I-1632 | IAC | Intermediário |
| 27 | Bom Repouso I-5085 | IAC | Intermediário |
| 28 | BGH-5935 | IAC | - |
| 29 | São José I-4999 | IAC | Intermediário |
| 30 | BGH-4842 | IAC | - |
| 31 | Catetinho Paraná I-1234 | IAC | Intermediário |
| 32 | Mendonça I-5062 | IAC | Intermediário |
| 33 | Tatuí I-3705 | IAC | Intermediário |
| 34 | Gigante de Tietê I-4652 | IAC | Intermediário |
| 35 | Gigante de Curitibanos | IAC | Intermediário |
| 36 | Areal n° 2 I-3968 | IAC | Intermediário |
| 37 | Vera Cruz I-5004 | IAC | Intermediário |
| 38 | BGH-4814 | IAC | - |
| 39 | BGH-5947 | IAC | |

ANEXO A – Acessos de alho (*Allium sativum* L.) do banco de germoplasma do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e do Departamento de Genética, ESALQ/USP (continuação)

Nº Id. Acesso **BAG** Ciclo fenológico 40 Chinês-ESALQ IAC Intermediário 41 Cateto Roxo I-99 **IAC** Intermediário 42 BGH-5963 IAC 43 BGH-5936 IAC BGH-6394 **IAC** 44 45 BGH 5952 IAC Roxo de Araras (2) IAC 47 48 Bulbinho Aéreo **IAC** IAC 70 Α В IAC 71 C IAC 72 D IAC 73 E IAC 74 F IAC 75 **76** Embrapa Cateto Roxo Livre de Vírus **IAC** Roxinho I-5063 (2) IAC Intermediário 77 Lavínia IAC-1632 (2) IAC Intermediário **79** Peruano Bisão ESALQ IAC 80 IAC Intermediário Chinês-ESALQ (2) 46 Andradas Manoel Lopez (2) 49 **IAC** Roxo de Minas (Dr. Joaquim) 50 IAC 51 Sr. Wilson (Bairro Godoí) **IAC** Bulbinho Aéreo Gigante de Curitibanos 52 **IAC** 53 Chinês Mogi IAC 54 Gigante **ESALQ** 55 Centenário **ESALQ** Tardio **56** Gigante Dez **ESALQ** 57 São José **ESALQ** Intermediário Lavínia **ESALQ** Intermediário 58 59 Caiano Branco **ESALQ** Cateto Branco 60 **ESALQ** 61 Crespo **ESALQ** Gigante Vinte 62 **ESALQ** 63 Cajuru **ESALQ** Precoce 64 Peruano **ESALQ** Ouro Fino 65 **ESALQ** 66 Sergipe **ESALQ** 67 Mineiro Branco **ESALQ** Precoce 68 Babás **ESALQ**

ANEXO A – Acessos de alho (*Allium sativum* L.) do banco de germoplasma do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) e do Departamento de Genética, ESALQ/USP

(conclusão)

| Nº Id. | Nº Id. Acesso | | Ciclo fenológico |
|--------|------------------|-------|------------------|
| 69 | Chinês Quatapara | ESALQ | - |
| 78 | Chinês-ESALQ (3) | ESALQ | Intermediário |

Nota: Nº Id., número de identificação do acesso; ciclo fenológico (TRANI et al. 1997).

ANEXO B – Acessos de *Allium sativum* L. do banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças (Brasília, DF) cedidos por Dr. Francisco Vilela Resende

(continua)

| | | | | (continua) |
|--------|--|--------------------|---------------|------------------|
| Nº Id. | Acesso | Origem | BAG | Ciclo fenológico |
| 81 | Araguari | Minas Gerais | Embrapa, 1976 | precoce |
| 82 | Barbado | São Paulo | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 83 | Branco Dourado | Mato Grosso do Sul | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 84 | Branco Mineiro | Minas Gerais | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 85 | Catiguá | Paraná | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 86 | Caturra | Paraná | Embrapa, 1976 | Intermediário |
| 87 | Centralina A | Minas Gerais | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 88 | Chileno (PR) | Paraná | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 89 | Chinês Real | China | Embrapa, 1976 | Intermediário |
| 90 | Cuiabá | Mato Grosso | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 91 | Dourado | Mato Grosso do Sul | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 92 | Gigante de Inconfidentes – bulbos longos | Minas Gerais | Embrapa, 1976 | Intermediário |
| 93 | Gigante de Lavínia | São Paulo | Embrapa, 1976 | Intermediário |
| 94 | Gigante Roxão | Minas Gerais | Embrapa, 1976 | Intermediário |
| 95 | Gigante Roxo | Minas Gerais | Embrapa, 1976 | Intermediário |
| 96 | Gravatá | Acre | Embrapa, 1976 | Intermediário |
| 97 | Hozan | China | Embrapa, 1976 | Intermediário |
| 98 | Inconfidentes II | Minas Gerais | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 99 | Inhumas A | Góias | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 100 | Inhumas Casca Roxa | Góias | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 101 | Jacobina | Bahia | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 102 | Jundiai | São Paulo | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 103 | Juiz de Fora | Minas Gerais | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 104 | Juréia | São Paulo | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 105 | Mexicano | México | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 106 | Mexicano A | México | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 107 | Mexicano B | México | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 108 | Mexicano II | México | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 109 | Morano Arequipeno | México | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 110 | Mucugê | Bahia | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 111 | Novo Cruzeiro | Minas Gerais | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 112 | Paraíba III | Paraná | Embrapa, 1976 | Precoce |
| | | | | |

ANEXO B — Acessos de $Allium\ sativum\ L.$ do banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças (Brasília, DF)

(continuação)

| | | | | (continuação) |
|--------|------------------------|--------------------------|---------------|------------------|
| Nº Id. | Acesso | Origem | BAG | Ciclo fenológico |
| 113 | Peruano | Peru | Embrapa, 1976 | Intermediário |
| 114 | Pinheral | Rio de Janeiro | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 115 | Piracicabano Amaralino | São Paulo | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 116 | Roxo Dourado | Mato Grosso do Sul | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 117 | Santa Izabel | Paraná | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 118 | Seleção I | Minas Gerais | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 119 | Tempero de Bode | Espiríto Santo | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 120 | Ugarte | São Paulo | Embrapa, 1976 | Precoce |
| 121 | DDR6024 | BAG USDA (EUA) | Embrapa, 1994 | Tardio |
| 122 | DDR6804 | Univ. Wisconsin (EUA) | Embrapa, 1996 | Tardio |
| 123 | DDR6807 | Univ. Wisconsin (EUA) | Embrapa, 1996 | Tardio |
| 124 | DDR6811 | Univ. Wisconsin (EUA) | Embrapa, 1996 | Tardio |
| 125 | DDR6822 | Univ. Wisconsin (EUA) | Embrapa, 1996 | Tardio |
| 126 | PI38383 | BAG USDA (EUA) | Embrapa, 1994 | Tardio |
| 127 | PI540318 | BAG USDA (EUA) | Embrapa, 1994 | Tardio |
| 128 | PI540351 | Univ. of Wisconsin (EUA) | Embrapa, 1996 | Tardio |
| 129 | RAI27 | Univ. Wisconsin (EUA) | Embrapa, 1996 | Tardio |
| 130 | RAI41 | Univ. Wisconsin (EUA) | Embrapa, 1996 | Tardio |
| 131 | RAI75 | Univ. Wisconsin (EUA) | Embrapa, 1996 | Tardio |
| 132 | RAI159 | BAG USDA (EUA) | Embrapa, 1994 | Tardio |
| 133 | RAI751 | Univ. Wisconsin (EUA) | Embrapa, 1996 | Tardio |
| 134 | RE PSK | Univ. Wisconsin (EUA) | Embrapa, 1996 | Tardio |
| 135 | RE6820 | Univ. Wisconsin (EUA) | Embrapa, 1996 | Tardio |
| 136 | UO73 | Univ. Wisconsin (EUA) | Embrapa, 1996 | Tardio |
| 137 | UO74 | BAG USDA (EUA) | Embrapa, 1994 | Tardio |
| 138 | UO79-3 | Univ. Wisconsin (EUA) | Embrapa, 1996 | Tardio |
| 139 | UO94-5 | Univ. Wisconsin (EUA) | Embrapa, 1996 | Tardio |
| 140 | UO94-11 | Univ. Wisconsin (EUA) | Embrapa, 1996 | Tardio |
| 141 | WE8407 | BAG USDA (EUA) | Embrapa, 1994 | Tardio |
| 142 | WE10735 | BAG USDA (EUA) | Embrapa, 1994 | Tardio |
| 143 | WE12832 | BAG USDA (EUA) | Embrapa, 1994 | Tardio |
| 144 | Chonan | Araras | Embrapa | Tardio |
| 145 | Roxo Pérola de Caçador | Mogi das Cruzes | Embrapa | Tardio |
| 146 | Jonas | - | Embrapa | Tardio |
| 147 | Quitéria | - | Embrapa | Tardio |
| 148 | Ito | - | Embrapa | Tardio |

ANEXO B – Acessos de *Allium sativum* L. do banco de germoplasma da Embrapa Hortaliças (Brasília, DF)

(conclusão)

| | | | | (|
|--------|---------------|--------|---------|------------------|
| Nº Id. | Acesso | Origem | BAG | Ciclo fenológico |
| 149 | San Valentin | - | Embrapa | Tardio |
| 150 | Roxo Caxiense | - | Embrapa | Tardio |
| 151 | Bergamota | - | Embrapa | Tardio |

Nota: Nº Id., número de identificação do acesso; ciclo, ciclo fenológico (comunicação pessoal Dr. Francisco Vilela Resende, Embrapa Hortaliças, Brasília, DF).

ANEXO C – Motivo e número de repetições de sequências microssatélites encontradas em clones isolados da biblioteca genômica enriquecida com microssatélites de *Allium sativum* L. desenvolvida no presente trabalho

Clone Motivo Classificação Clone Motivo Classificação A01.1 G07.1 (GAG)₄ Perfeito $(GA)_{28}$ Perfeito A08.1 $(CT)_{27}$ Perfeito H03.1 Perfeito $(GA)_6$ B01.1 $(CT)_{16}$ Perfeito A04.2 $(GA)_{24}$ Perfeito B06.1 (GTGAG)₃ Perfeito A08.2 Perfeito $(CT)_5$ B08.1 $(CTG)_7$ Perfeito A08.2 Perfeito $(CT)_5$ B08.1 (TCAGG)₅ Perfeito Perfeito A12.2 $(TCC)_{11}$ B08.1 Interrompido B07.2 Perfeito (TC)₁₇ (TC)₅ $(CT)_5$ B10.1 Perfeito B09.2 $(TTC)_7$ Perfeito $(AT)_5$ B11.1 B10.2 Perfeito $(GCAT)_3$ Perfeito $(CTT)_9$ C10.1 (AGA)₄ Perfeito B11.2 $(GT)_7$ Perfeito D04.1 (AAG)₂ AAC (AAG)₃ C (AAG)₁₄ Interrompido B12.2 (ATCA)₃ Perfeito D05.1 Perfeito Perfeito $(CT)_{22}$ C12.2 $(AC)_{12}$ D10.1 $(CTT)_7$ Perfeito D02.2 $(TC)_9$ Perfeito Perfeito E04.1 $(TTC)_{11}$ Perfeito E04.2 $(CA)_5$ E07.1 Perfeito E07.2 $(TG)_5$ Perfeito $(CT)_{18}$ E08.1 (CGC)₄ Perfeito E09.2 $(CT)_{23}$ Perfeito E12.1 F03.2 $(GA)_6$ Perfeito $(AC)_8$ Perfeito F08.1 $(AAAG)_3$ Perfeito F10.2 $(CCT)_4 (CCT)_3 (CTT)_{21}$ Composto F09.1 $(GT)_8$ Perfeito F12.2 $(TC)_5$ Perfeito F11.1 $(CT)_{18}$ Perfeito G06.2 $(TTGT)_3$ Perfeito F11.1 G09.2 $(CAA)_4$ Perfeito $(CA)_8$ Perfeito G06.1 Perfeito H08.2 Perfeito $(GT)_{25}$ $(AG)_{21}$

ANEXO D – Frequências alélicas por loco e por banco de germoplasma de alho (continua)

| | | | | | (continua) |
|--------|--------|------------------------|--------|---------|------------|
| Loco | Alelos | Frequência Alélica (%) | | | |
| | (pb) | IAC | ESALQ | Embrapa | Total |
| | 229 | 16,67 | | | 1,54 |
| Asa07 | 231 | 50,00 | 50,00 | 57,89 | 59,92 |
| | 235 | 33,33 | 50,00 | 42,11 | 41,54 |
| | 209 | | | 4,39 | 3,91 |
| | 211 | 20,00 | 50,00 | 11,40 | 13,28 |
| | 213 | | | 7,89 | 7,03 |
| Asa08 | 217 | | •• | 2,63 | 2,34 |
| 113400 | 221 | 10,00 | •• | 23,68 | 21,88 |
| | 235 | 20,00 | 50,00 | 21,93 | 22,66 |
| | 245 | 30,00 | | 28,07 | 27,34 |
| | 257 | 20,00 | | •• | 1,56 |
| | 225 | | | 9,65 | 8,46 |
| | 227 | | | 26,32 | 23,08 |
| Asa10 | 231 | 66,67 | 100,00 | 43,86 | 47,69 |
| | 235 | 33,33 | | 18,42 | 19,23 |
| | 239 | •• | •• | 1,75 | 1,54 |
| | 220 | 16,67 | 25,00 | 25,45 | 24,60 |
| Asa14 | 222 | | | 21,82 | 19,05 |
| Asair | 224 | 33,33 | 25,00 | 13,64 | 15,87 |
| | 234 | 50,00 | 50,00 | 39,09 | 40,48 |
| Asa16 | 148 | 66,67 | 100,00 | 78,95 | 78,46 |
| Asaio | 154 | 33,33 | •• | 21,05 | 21,54 |
| | 126 | 33,33 | | 66,07 | 60,94 |
| | 136 | 16,67 | | | 1,56 |
| Asa17 | 154 | | •• | 1,79 | 1,56 |
| | 176 | 16,67 | 50,00 | 32,14 | 31,25 |
| | 196 | 33,33 | 50,00 | •• | 4,69 |
| Asa18 | 254 | 83,33 | 100,00 | 86,79 | 86,89 |
| 715010 | 264 | 16,67 | •• | 13,21 | 13,11 |
| | 149 | | | 0,88 | 0,77 |
| | 151 | •• | •• | 7,89 | 6,92 |
| | 153 | •• | •• | 11,40 | 10,00 |
| Asa24 | 155 | 16,67 | •• | 22,81 | 21,54 |
| | 157 | 50,00 | 50,00 | 37,72 | 39,23 |
| | 159 | •• | •• | 4,39 | 3,85 |
| | 161 | 33,33 | 50,00 | 14,91 | 17,69 |
| | 117 | 25,00 | 50,00 | 34,69 | 34,21 |
| | 119 | •• | •• | 6,12 | 5,26 |
| Asa25 | 121 | 25,00 | •• | 9,18 | 10,53 |
| | 123 | 25,00 | 50,00 | 34,69 | 34,21 |
| | 125 | | •• | 5,10 | 4,39 |
| | 127 | 25,00 | •• | 10,20 | 11,40 |
| Asa31 | 237 | 83,33 | 100,00 | 32,65 | 40,35 |
| 110001 | 243 | 16,67 | •• | 67,35 | 59,65 |
| | | | | | |

ANEXO D – Frequências alélicas por loco e por banco de germoplasma de alho

| | Alelos Frequência Alélica (%) | | | Alélica (%) | (conclusão |
|-------------|-------------------------------|-----------|--------------------|----------------|----------------|
| Loco | (pb) | IAC | Embrapa | Total | |
| | 252 | 33,33 | ESALQ 50,00 | 20,54 | 22,66 |
| | 254 | | | 1,79 | 1,56 |
| | 260 | 33,33 | 50,00 | 20,54 | 22,66 |
| | 262 | 33,33 | 30,00 | 1,79 | 1,56 |
| | 270 | | •• | 5,36 | 4,69 |
| | 275 | | •• | 8,04 | 7,03 |
| GB-ASM-040 | 278 | 16,67 | •• | 6,25 | 7,03 |
| GD HOM 040 | 280 | | •• | 5,36 | 4,69 |
| | 282 | | •• | 5,36 | 4,69 |
| | 285 | | •• | 8,04 | 7,03 |
| | 288 | 16,67 | •• | 8,93 | 9,38 |
| | 292 | | •• | 5,36 | 4,69 |
| | 298 | •• | •• | 2,68 | 2,34 |
| | 160 | 16,67 | •• | | 1,54 |
| | 162 | 33,33 | 25,00 | 21,93 | 23,08 |
| GB-ASM-053 | 165 | 50,00 | 50,00 | | 61,54 |
| | | 30,00 | | 63,16 14,91 | |
| | 168 | 33,33 | 25,00 | • | 13,85 |
| | 260 | , | 50,00 | 17,54 | 20,00 26,15 |
| | 265 | 33,33 | 50,00 | 24,56 | |
| | 268 | •• | •• | 1,75 | 1,54 |
| | 276 | •• | •• | 1,75 | 1,54 |
| | 278 | •• | •• | 4,39 | 3,85 |
| CD ACM OFO | 280 | •• | •• | 3,51 | 3,08 |
| GB-ASM-059 | 282 | •• | •• | 4,39 | 3,85 |
| | 284 | •• | •• | 1,75 | 1,54 |
| | 286 | | •• | 6,14 | 5,38 |
| | 288 | 16,67 | •• | 7,02 | 7,69 |
| | 290 | •• | •• | 3,51 | 3,08 |
| | 292 | | •• | 14,04 | 12,31 |
| | 295 | 16,67 | | 9,65 | 10,00 |
| | 182 | 66,67 | 100,00 | 34,21 | 39,23 |
| GB-ASM-072 | 185 | 33,33 | •• | 40,35 | 38,46 |
| | 188 | | | 25,44 | 22,31 |
| | 184 | 16,67 | | 5,26 | 6,15 |
| | 190 | 66,67 | 100,00 | 29,82 | 35,38 |
| GB-ASM-078 | 205 | | •• | 3,51 | 3,08 |
| | 210 | 16,67 | | 59,65 | 53,85 |
| | 218 | •• | •• | 1,75 | 1,54 |
| GB-ASM-080 | 152 | 16,67 | | 15,91 | 15,38 |
| OD-WOMI-000 | 158 | 83,33 | 100,00 | 84,09 | 84,62 |
| | 202 | | | 3,45 | 2,94 |
| | 205 | •• | | 44,83 | 38,24 |
| GB-ASM-109 | 210 | 40,00 | | 41,38 | 41,18 |
| QD-ASM1-103 | 214 | 60,00 | 100,00 | 3,45 | 11,76 |
| | 218 | •• | •• | 5,17 | 4,41 |
| | 224 | | | 1,72 | 1,47 |

Notas: Sinal convencional utilizado

^{..} não se aplica dado numérico.