

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA
CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS ACESSOS
DO BANCO ATIVO DE GERMOPLASMA DE ALHO
(*Allium sativum* L.) DE SANTA CATARINA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre do Curso de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina.

Autor: Renato Luís Vieira

Orientador: Prof. Dr. Rubens Onofre
Nodari

FLORIANÓPOLIS
SANTA CATARINA - BRASIL
MARÇO-2004

A minha esposa Auria e meus filhos

Guilherme e Marina,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador Rubens Nodari, pela amizade, confiança, ensinamentos e pela valiosa colaboração durante toda a pesquisa.

À Epagri pela oportunidade ímpar, aos funcionários da Estação Experimental de Caçador, que de uma maneira ou outra me apoiaram, em especial ao pesquisador Siegfried Mueller pela amizade, apoio e incentivo aos trabalhos de pesquisa.

Ao pesquisador Dr. José Biasi, por compartilhar seus conhecimentos durante o período em que convivemos na Epagri.

À Universidade do Contestado, pela concessão de bolsa, sem a qual tornaria mais difícil a realização desta pesquisa.

A Berna, pela amizade e paciência e os professores do departamento de Fitotecnia do CCA/UFSC pela amizade e ensinamentos.

As colegas: Adriana Dandas, Karine Santos e Liziane Kadine, pela amizade e por toda ajuda durante os trabalhos realizados no Laboratório de Genética.

Aos amigos Mauricio Lenzi, Andréa e Luciana pela amizade e apoio, e a todos os colegas do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal pelo incentivo.

Aos colegas do Núcleo de Pesquisa de Florestas: Marcelo Mantovani, Alexandre Siminski e Ângelo, pela colaboração prestada.

A todos meus familiares que, de alguma forma contribuíram para realização de mais esta etapa de minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
INTRODUÇÃO	1
1. REVISÃO DE LITERATURA	3
1.1 ORIGEM E BOTÂNICA DO <i>Allium sativum</i> L	3
1.2 MELHORAMENTO GENÉTICO DO <i>Allium sativum</i> L.....	3
1.3 MARCADORES GENÉTICOS	6
1.4 MARCADORES GENÉTICOS NA ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Allium sativum</i> L.....	8
2. OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GERAL	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 GERMOPLASMA AMOSTRADO.....	11
3.2 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA	11
3.2.1 Caracterização Morfológica (Descritores Morfológicos).....	11
3.2.2 Eletroforese de Isoenzimas.....	12
3.2.2.1 Obtenção da Amostras Foliare	12
3.2.2.2 Preparação de Gel e Soluções Tampões Gel/Eletrodo	12
3.2.2.3 Análise dos Dados	16
3.2.3 Marcadores RAPD	18
3.2.3.1 Extração de DNA Total de <i>Allium sativum</i>	18
3.2.3.2 Otimização do protocolo de Amplificação e Resolução	19
3.2.3.3 Análise da Diversidade Genética	19
3.2.4 Marcadores AFLP	20
3.2.4.1 Adaptação do Protocolo Para Marcadores AFLP	20
3.2.4.2 Análise da Diversidade genética	21
4. RESULTADOS	22

4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	22
4.2. ELETROFORESE DE ISOENZIMAS	29
4.2.1 <i>Sistemas Tampões Eletrodo/Gel e Coloração Testados</i>	29
4.2.2 <i>Análise da Diversidade Genética</i>	30
4.3 MARCADORES RAPD	39
4.3.1 <i>Otimização do Protocolo Para Marcadores RAPD</i>	39
4.3.2 <i>Nível de Polimorfismo</i>	40
4.3.3 <i>Análise da Diversidade Genética a Partir de Marcadores RAPD</i>	41
4.4 MARCADORES AFLP	44
4.4.1 <i>Padronização do protocolo Para Marcadores AFLP</i>	44
4.4.2 <i>Análise da Diversidade Genética a Partir de Marcadores AFLP</i>	44
4.5 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA CONJUNTA COM MARCADORES RAPD E AFLP	49
4.6 ANÁLISE COMPARATIVA DA SIMILARIDADE GENÉTICA DETECTADA PELOS MARCADORES MORFOLÓGICOS, ISOENZIMÁTICOS, RAPD E AFLP	52
DISCUSSÃO	56
CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	71
REFERÊNCIAS	73
ANEXOS	81

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação gráfica dos descritores (1 a 16) no espaço dos componentes principais I e II, representando juntos 50,4% da variação total dos dados24
- Figura 2:** Representação gráfica dos descritores e amostras no espaço dos componentes principais I e II, representando juntos 50,4% da variância total dos dados.....25
- Figura 3:** Dendograma de similaridade para os acessos do BAG de alho de Santa Catarina, obtido através de análise de agrupamento, empregando-se descritores morfológicos.....27
- Figura 4:** Características de bulbos e bulbilhos dos acessos de alho crioulo; A: bulbo e bulbilhos representativo do grupo I; B: bulbo e bulbilhos representativo do grupo II; C: bulbo e bulbilhos representativa do grupo III.....29
- Figura 5:** Padrões eletroforéticos e mobilidade relativa ($R_f \times 100$) em acessos de alho; ACP: 3 padrões, ADH: 3 padrões, G2DH: 3 padrões, G6PDH: 2 padrões, MDH: 4 padrões, e PGI: 4 padrões30
- Figura 6:** Dendograma de Similaridade genética não viesada de NEI (1978), obtido através da técnica UPGMA, para 20 cultivares de alho, empregando-se 7 locos alozímicos.....36
- Figura 7:** Aspecto geral das folhas de plantas de alho, A: folhagem representativa do grupo I-a, clone tipo Chinesão; B: folhagem representativa do grupo II-c, clone tipo Cará; C: folhagem representativa do grupo III-b, clone tipo Contestado e D: folhagem representativa do grupo IV-a, clone tipo Rei38
- Figura 8:** . Características de bulbos e bulbilhos de alho, A: bulbo e bulbilhos representativo do grupo I-a, clone tipo Chinesão; B: bulbo e bulbilhos representativo do grupo II-c, clone tipo Cará; C: bulbo e bulbilhos representativa do grupo III-b, clone tipo Contestado e D) bulbo e bulbilhos representativo do grupo IV-a, clone tipo Rei.....89
- Figura 9:** Número total de bandas, número de bandas polimórficas e porcentagem de bandas polimórficas para iniciadores RAPD, utilizados para análise da diversidade genética do BAG de alho de Santa Catarina.....40
- Figura 10:** Padrões de fragmentos de DNA, amplificados em gel de agarose 1,5%, dos acessos de alho: OPB18: acessos 1 a 22; OPC09: acessos 23 a 44; OPC07: acessos 45 a 73 ; M) Ladder 1Kb.....42
- Figura 11:** Dendograma de similaridade genética obtida através do índice de Jaccard, de 96 acessos de alho, estimado a partir de 47 marcadores RAPD.....43
- Figura 12:** Amplificação de marcadores AFLP em genótipos do BAG de alho de Santa Catarina: A) E-ACG + M-CAG; B) E-ACT + M-CTA e C) E-ACC + M-CAT.....47
- Figura 13:** Dendograma de similaridade genética obtida através do índice de Jaccard, de 96

<i>acessos de alho, estimado a partir de 48 marcadores AFLP.....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 14:</i> <i>Dendograma de similaridade genética obtida através do índice de Jaccard, de 96 acessos de alho, estimado com 47 marcadores RAPD e 48 marcadores AFLP agrupados.....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 15:</i> <i>Dendograma de similaridade genética obtida através do índice de Jaccard, de 20 cultivares de alho, estimado a partir de 47 marcadores RAPD</i>	<i>52</i>
<i>Figura 16:</i> <i>Dendograma de similaridade genética obtida através do índice de Jaccard, de 20 cultivares de alho, estimado a partir de 48 marcadores AFLP.....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 17:</i> <i>Dendograma de similaridade genética de 20 cultivares de alho, estimado com 16 marcadores morfológicos.....</i>	<i>46</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: <i>Sistemas de tampão eletrodo/gel testados em Allium sativum L.....</i>	13
Tabela 2: <i>Sistemas enzimáticos (coloração) testados para eletroforese de isoenzimas em Allium sativum L.....</i>	15
Tabela 3: <i>Variância cumulativa dos eixos componentes principais (ECP), utilizados na análise de caracterização dos acessos do BAG de alho de Santa Catarina.....</i>	22
Tabela 4: <i>Contribuição absoluta de descritores na caracterização morfológica dos acessos do BAG de alho de Santa Catarina por Análise de Componentes Principais.....</i>	23
Tabela 5: <i>Agrupamento dos acessos do BAG de alho de Santa Catarina obtido através de descritores morfológicos</i>	28
Tabela 6: <i>Numero médio de alelos por loco (A), proporção de locos polimórficos (P) e heterozigosidade observada (Ho) dos 20 acessos de alho, a partir de 7 locos alozímicos.....</i>	32
Tabela 7: <i>Similaridade (diagonal superior) e distância genética (diagonal inferior) não viesadas de NEI (1978), para os 20 acessos de alho.....</i>	33
Tabela 8: <i>Padrões isoenzimáticos e características morfológicas utilizadas para agrupamento dos acessos do BAG de alho de Santa Catarina.....</i>	37
Tabela 9: <i>Combinações de iniciadores testados no protocolo de marcadores AFLP, número total de bandas, número total de bandas polimórficas e porcentagem de bandas polimórficas geradas</i>	45
Tabela 10: <i>Iniciadores utilizados nas reações RAPD e AFLP e respectivos índices de diversidade genética para os 96 acessos do BAG de alho de Santa Catarina.....</i>	49

RESUMO

A organização da variabilidade genética de acessos de alhos mantidos em Bancos de Germoplasma tem sido bastante investigada com marcadores morfológicos e isoenzimáticos. Porém, a informação obtida com esses marcadores tem sido considerada inadequada, devido ao pequeno número de marcadores disponíveis e a pequena porção genômica acessada, respectivamente. Por outro lado, os marcadores genéticos baseados na análise direta da molécula de DNA, como RAPDs e AFLPs, permitem acesso a uma ampla região, distribuída ao acaso, devido sua capacidade multiplex e alto nível de polimorfismo detectado. Assim, o presente trabalho apresenta os resultados referentes (i) a avanços metodológicos e adequação de protocolos que possibilitaram o uso de descritores morfológicos e marcadores isoenzimáticos, RAPD e AFLP, (ii) a caracterização da diversidade genética acompanhada da análise de agrupamento dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma de *Allium sativum* L. do Estado de Santa Catarina, (iii) bem como a análise comparativa envolvendo os diferentes marcadores genéticos. Constatou-se através de análise multivariada que 10 descritores morfológicos, dos 17 utilizados, foram de grande importância para caracterização dos 96 acessos de alho, sendo responsáveis por 63% da variação total disponível no conjunto de dados. Cinco desses descritores são recomendados pelo IPGRI para estudos de diversidade genética desta espécie. Além dos cinco sistemas isoenzimáticos já de amplo uso em alho, a saber ACP, ADH, G6MDH, MDH e PGI, um sexto sistema, G2DH foi adaptado pela primeira vez para alho. A análise isoenzimática revelou que as cultivares comerciais apresentaram cinco padrões diferenciados. Entre as 20 cultivares avaliadas o percentual de locos polimórficos (P) variou de 0 a 57,1, sendo o valor médio 13,6%. A heterozigotidade variou de 0, observada em vários genótipos homozigotos, a 0,57 na cultivar Rei, pertencente a espécie *A. ampeloprasum*. Tomando-se o grupo das 20 cultivares como uma população, a heterozigotidade foi de 0,136, sendo 86% o percentual de locos polimórficos. No protocolo otimizado para a técnica RAPD, 16% dos iniciadores testados amplificaram um total de 47 bandas sendo que dessas, 25 revelaram polimorfismo e foram utilizadas na avaliação dos acessos. O maior avanço obtido na adaptação de protocolo da técnica AFLP foi a identificação de três novas combinações de iniciadores, e sua utilização pela primeira vez na análise de *Allium sativum*. O protocolo possibilitou um número variável de bandas polimórficas por combinação, entre 13 e 20 bandas, dependendo da combinação utilizada. A caracterização genética dos acessos de *A. sativum*, foi realizada a partir de 16 marcadores morfológicos, sete locos isoenzimáticos, 47 marcadores RAPD, 48 marcadores AFLP e com 95 marcadores RAPD e AFLP agrupados. O grupo de 76 acessos de alho crioulo foi separado em três grupos de similaridade em todas as análises a que foram submetidos. No entanto, apenas 25 acessos foram considerados inequivocadamente como genótipos distintos. Em todas as análises, as 20 cultivares comerciais foram separadas em sete grupos de similaridade, sendo detectado apenas

duas cultivares potencialmente duplicadas, uma de origem nacional e a outra de origem chinesa. Os dendogramas de similaridade genética gerados a partir dos marcadores isoenzimáticos, RAPD e AFLP, apresentaram elevada concordância, sendo as correlações de 0,54 entre isoenzimas e RAPD, 0,64 entre isoenzimas e AFLP e de 0,89 entre RAPD e AFLP, todas significativas pelo teste de Mantel. O grau de concordância encontrado neste trabalho, entre esses marcadores, foi superior ao encontrado em outros trabalhos de análise de diversidade genética. Assim, as principais conclusões deste trabalho foram: a) apesar da espécie em foco ser de propagação praticamente assexuada, os valores de heterozigosidade encontrados na análise de isoenzimas, sugerem que existe uma quantidade razoável de variabilidade genética entre os acessos; b) a utilização das técnicas moleculares mais modernas, pode possibilitar maior grau de segurança na discriminação, e conseqüentemente na recomendação desses genótipos, para atender as diversas regiões climáticas e c) o uso de marcadores moleculares se mostrou adequado neste estudo e, a possibilidade de obtenção de sementes botânicas de alho, abre espaço para o uso dessa técnica como suporte para a ampliação das atividades dos programas de melhoramento através de cruzamentos, aproveitando a variabilidade das linhagens segregantes. Os resultados referentes a avanços metodológicos e adequação de protocolos, obtidos neste trabalho, representam uma contribuição para a pesquisa, introdução e avaliação de acessos de alho em Bancos de Germoplasma. Porém, os resultados relacionados a caracterização, notadamente aqueles relacionados a parâmetros morfológicos, devem ser tomados com cautela, devendo-se considerar a interação desses genótipos com os diversos tipos de ambiente onde os mesmos são avaliados.

ABSTRACT

The organization of the genetic variability of garlic accesses maintained in Germplasm Banks has been widely investigated with morphologic and allozymic markers. However, the information provided by these markers has been considered unsatisfactory, respectively due to the small number of available markers and the small genomic portion accessed by them. Alternatively, the genetic markers based on a direct analysis of the DNA molecule, like RAPDs and AFLPs, permit access to a wide genomic region, randomly distributed, due to its multiplex ability and high level of polymorphism detected. This research presents the results related to: (i) methodological advances and protocol adjustment that made possible the use of morphological descriptors and isozyme, RAPD and AFLP markers; (ii) The characterization of the genetic variation accompanied by the grouping analysis of the entries of the *Allium sativum* L. Germplasm Bank of Santa Catarina State, and (iii) the comparative analysis involving the different genetic markers. Using the multivariate analysis it was found that 10 of the 17 used morphological descriptors were very important to characterize the 96 garlic entries, which responded for 63% of the total variation available in the database. Five of these descriptors are recommended by IPGRI for studying the genetic diversity of this species. In addition to the ACP, ADH, G6MDH, MDH, and PGI isozyme systems, the G2DH was now adapted for garlic. The isozyme analysis showed that the commercial varieties had five differentiated patterns. Among the 20 varieties evaluated, the percent of polymorphic loci (P) varied from 0 to 57.1%, with an average of 13.6%. The heterozygosity varied from 0, observed in various homozygotic genotypes, to 0,57 in the cultivar Rei, which belongs to the *A. ampeloprasum* species. Considering the group of 20 varieties evaluated as a population, the heterozygosity was 0.136, being 86% the amount of polymorphic loci. With the optimized protocol for the RAPD technique, 16% of the primers tested amplified 47 bands. Twenty five of these bands revealed polymorphism, and were used to evaluate the plant accesses. The greatest advance obtained with the protocol adaptation of the AFLP technique was the identification of three new combinations of primers, and its use by the first time in *Allium sativum* analysis. The protocol made available between 13 and 20 polymorphic bands, depending on the primers combination used. The genetic characterization of the *Allium sativum* accesses was done from 16 morphologic markers, seven isozyme loci, 47 RAPD markers, 48 AFLP markers, and 95 RAPD and AFLP grouped markers. The 76 accesses, representing the country garlic landraces were separated in three groups of genetic similarity, considering the index of 0.93 of genetic similarity in all analysis made with them. Nevertheless, only 25 accesses were unquestionable considered as different genotypes. In all analysis, the 20 commercial varieties were separated in seven groups by similarity. Only one from Brazil and another from China were potentially duplicated varieties. The genetic similarity dendograms generated from isozyme markers, RAPD, and AFLP, had high level of

agreement. There was a 0.54 correlation between isozymes and RAPD, 0.64 between isozymes and AFLP, and 0.89 between RAPD and AFLP, all values statistically significant by the Mantel test. The agreement level, found between these markers in this research, were higher than those found in other genetic diversity analysis works. Thus, the main conclusions of the present work were: a) although this species is of practically asexual propagation, the heterozygosity values found in the isozyme analysis suggest that there is a reasonable genetic diversity among accesses; b) the utilization of molecular techniques provided more assurance in the discrimination, and, consequently, for further recommendation of these genotypes for the different climatic regions, and c) the use of molecular markers was adequate in this study, and the possibility for obtaining botanic garlic seeds gives way for the use of this technique as support to increase the activities in the breeding programs, taking benefit from the variability of the segregating lines. The results related to the method advances and protocol adequacy obtained in this work become a contribution for research, introduction, and evaluation of garlic accesses in Germplasm Banks. However, the results related to characterization, especially those related to morphologic parameters, must be used carefully and must consider the interaction of these genotypes with the environment where they are evaluated.

INTRODUÇÃO

A cultura do alho (*Allium sativum* L.), nos últimos anos, tem demonstrado um desempenho positivo nas explorações das lavouras realizadas nos principais países produtores tais como Argentina, Brasil, China, Estados Unidos e Egito. A China é o maior produtor, e a cada ano vem expandindo suas fronteiras para a alhicultura, sendo responsáveis por aproximadamente 56% da área total plantada no mundo, gerando um volume de produção de 8,7 milhões de toneladas, o que representa um percentual de 72% da oferta mundial total desse produto (Icepa, 2003).

O alho é uma das hortaliças mais cultivadas no Brasil, e tem grande importância sócio-econômica, em especial nas regiões Sul e Centro-Oeste. O uso intensivo de mão-de-obra, tecnologia e capital, tem viabilizado a pequena e média propriedade nas regiões frias produtoras de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. No Estado de Santa Catarina a cultura está entre as quatro hortaliças mais cultivadas juntamente com a batata, cebola e o tomate, sendo o segundo maior produtor no ano de 2001, passando para o quarto lugar no ano seguinte, superado pelos Estados do Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Goiás, que também ultrapassaram a produtividade média catarinense. Apesar disso, o Estado de Santa Catarina sempre se destacou, no cenário nacional com produtividades expressivas. Esta performance do Estado no cenário nacional pode ser atribuída, principalmente, à adoção de técnicas modernas de cultivo sugeridas pelos órgãos de pesquisa e extensão rural do Estado e das cooperativas de produtores (Icepa, 2003).

Apesar da sua importância, no Estado de Santa Catarina e também no país, a produção entrou em crise a partir de 1994, com o início da importação do produto da China e da Argentina, a preços bastante competitivos, inclusive com prática de *dumping* comprovada. Diante disso, os produtores brasileiros vêm se empenhando para alcançar a auto-suficiência do país no abastecimento de alho, com adoção de tecnologia adequada, aumento da área cultivada, aumento da produtividade e utilização de novas cultivares.

A maioria das cultivares de alho existentes no Brasil são originadas por meio de seleção e diferenciam-se quanto às exigências em fotoperíodo e temperatura, ciclo, características morfológicas, resistência a pragas e doenças, e produtividade. No entanto, tais características também podem ser afetadas por fatores ambientais (Mascarenhas, 1978). Atualmente, no Estado de Santa Catarina, estão sendo recomendadas as seguintes cultivares de alho, as quais foram obtidas através de seleção em Bancos de Germoplasma: Cará,

Gigante, Contestado, Caçador, Jonas, Roxo Caxiense, Chonan e Quitéria (Mueller *et al.*, 2002).

No Sul do Brasil, a comprovação da superioridade em qualidade, produtividade e existência de variabilidade do germoplasma de alho tem sido obtido através de coletas locais, quando comparado ao introduzido de outras regiões (Augustin e Garcia, 1993). Estas coletas, por outro lado, revelam a existência de genótipos muito semelhantes e, com denominações diferentes, variando com a localidade. Acessos que apresentam razoável uniformidade, já poderiam ser caracterizados como novas cultivares (Biasi e Mueller, 1989).

O Estado de Santa Catarina mantém, através da Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária e Difusão de Tecnologia – EPAGRI, um Banco Ativo de Germoplasma de alho composto de 110 acessos, a maioria resgatados das comunidades rurais do Estado, sendo alguns deles cultivados em diversas regiões de produção do Brasil. Considerando-se que o Germoplasma de alho do nosso estado é constituído por um elevado número de genótipos, cuja diversidade genética não é totalmente conhecida, o presente trabalho propõe-se a caracterizar geneticamente todos os acessos mantidos em conservação visando apoiar programas de melhoramento genético dessa espécie, cuja meta principal é fornecer material genético para o desenvolvimento de novos genótipos que possuam características de importância agrônômica e comercial.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 ORIGEM E BOTÂNICA DO *Allium sativum* L.

O alho é uma espécie cultivada há milhares de anos, sendo o seu centro de origem principal as zonas temperadas da Ásia Central, de onde se espalhou para a região do Mediterrâneo, para constituir o centro secundário de expansão, onde suas virtudes são talvez ainda mais consideradas do que em qualquer outra região do mundo (Harvey, 1995).

Allium sativum L. é uma espécie diplóide ($2n = 16$), assexuada e vivípara (Jones e Mann, 1983). Da família Aliaceae, é uma planta herbácea que atinge 0,40 - 0,70 m de altura, dependendo da cultivar. Possui folhas lanceoladas, com o limbo medindo de 0,20 a 0,30 m de comprimento. O pseudocaule é formado pelas bainhas das folhas, as quais se implantam em um caule pequeno e achatado. Sob condições climáticas favoráveis, as gemas do caule desenvolvem-se formando cada uma um bulbilho, que em seu conjunto formam o bulbo. O bulbo é arredondado, às vezes levemente periforme, sendo constituído por 5 até 20 bulbilhos, as vezes mais. Estes últimos tem geralmente morfologia ovóide-arqueada, algo faciforme, sendo envoltos por duas (raramente uma ou mais de duas) folhas protetoras (brácteas), de coloração branca ou arroxeadas. Os bulbilhos estão ligados ao caule pela base, estando recobertos por várias folhas, que em seu conjunto constituem a capa (túnica). A capa é delgada, de coloração branca, arroxeadas ou amarronzadas, o que confere uma aparência suja ao conjunto. Estas folhas tornam-se quebradiças, quando secas, possibilitando assim um preparo para a embalagem e a venda. Na porção basal do caule fica situado o sistema radicular. As raízes formam um sistema radicular do tipo fasciculado, atingindo profundidades desde 40 até 82 cm. As folhas nascem na parte superior do caule, variando de estreitas a largas podendo a superfície apresentar-se lisa ou com maior cerosidade. O escapo floral, quando presente, tem sua origem no centro do bulbo (Harvey, 1995).

1.2 MELHORAMENTO GENÉTICO DO *Allium sativum* L.

A seleção dos genitores e a caracterização da variabilidade genética existente são decisivos para o incremento de eficiência em programas de melhoramento (Barbosa Neto, 1996). Na implantação de um programa de melhoramento, uma das principais necessidades do melhorista é a identificação de plantas que possuam genes superiores em uma progênie

segregante (Weeden et al., 1994). O melhoramento de plantas, portanto, só ocorre com base na variabilidade genética.

Embora o alho venha sendo cultivado desde épocas imemoriais, a base genética utilizada é reduzida e se concentra praticamente nos clones atualmente em cultivo. O alho tem sido descrito como uma espécie estéril ou como planta típica apomítica obrigatória (Etoh, 1980). Portanto, o melhoramento clássico dessa hortaliça, com a utilização de cruzamentos para se aumentar a variabilidade genética, tem sido descartado devido a natureza reprodutiva da mesma (Pooler e Simon, 1993). A propagação do alho tem sido feita assexuadamente por meio de bulbilhos retirados da base da planta, ou por bulbilhos aéreos das inflorescências. Até recentemente apenas clones estéreis tinham sido relatados.

Segundo Takenaka (1933), o alho é um híbrido estéril resultante do cruzamento de duas espécies ancestrais férteis. Os botões florais não conseguem competir com o rápido desenvolvimento dos bulbilhos vegetativos aéreos. Entretanto, mesmo em clones onde há formação de botões, as flores continuam estéreis na maioria dos clones, pois os micrósporos degeneram antes da mitose Koul & Gohil (1970). Para Novak (1972) e Etoh (1980, 1982), ocorre uma degeneração do *tapetum* das anteras. Outro mecanismo proposto para a esterilidade é a existência de doenças degenerativas, como as causadas por vírus e micoplasmas, interferindo na reprodução sexual (Konvicka, 1973; Konvicka et al., 1978). Entretanto, Etoh & Ogura (1977) observaram que as anomalias morfológicas encontradas nas flores de alho ocorreram associadas à esterilidade, e que essas anormalidades poderiam estar contribuindo para a mesma. Posteriormente, Pooler & Simon (1993), sugeriram que a produção de gametas balanceados estaria sendo reduzida significativamente, devido a acúmulo de aberrações cromossômicas, como aneuploidia, translocação e/ou inversões, dado o fato da espécie ter sido propagada assexuadamente por muitas gerações.

Várias tentativas têm sido feitas para a produção de grãos de pólen férteis e, conseqüentemente, a produção de sementes de alho. Etoh (1980) tentou obter pólen na cultivar Shanhai-Wase, originária da China, pois nesta região produz inflorescência contendo abundância de botões florais. Entretanto, apesar do cultivo de inflorescência em meio de MS acrescido de tetraciclina, ou em água destilada com a presença de tetraciclina, o mesmo autor conseguiu obter grãos de pólen binucleados, porém nenhum fértil.

O clone Moscou 130 foi produzindo com grãos de pólen viáveis, dentre uma coleção de 153 cultivares de alho (Etoh, 1983). Após realizado a auto-fecundação, este autor obteve 27 sementes oriundas de 13 ovários, de um total de 76 polinizados. Após escarificação, sete plântulas foram obtidas. Esse autor sugeriu que outros clones férteis poderiam ser encontrados

na região de origem do alho. Kononkov (1953), citado por Etoh (1985), reportou a produção de sementes botânicas de alho a partir de um clone fértil obtido de uma coleção oriunda da presumida região de origem do alho na Ásia.

Uma das hipóteses correntes é a de que o alho provavelmente evoluiu de formas férteis para estéreis, e que clones férteis poderiam ainda sobreviver na área de origem da espécie. Etoh (1983) coletou 31 clones na região da Ásia Central da ex-União Soviética, nas fronteiras com o Afeganistão, Irã e China. Após florescimento em campo no Japão, a análise do índice de fertilidade de pólen resultou em valores viáveis de 19,6 a 90,3% em 14 clones coletados. Clones macho-estéreis com óvulos férteis também foram identificados. Sementes verdadeiras foram obtidas após intercruzamentos entre os clones férteis, associados com a eliminação dos bulbilhos aéreos. O autor também estabeleceu a associação entre a cor das anteras e a fertilidade do pólen produzido. Todos os clones com antera de cor púrpura produziram pólen fértil na antese; os com anteras amarelas produziram apenas pólen estéril.

Allium longicuspis tem sido considerada como espécie selvagem predecessora de *A. sativum* (McCollum, 1976). Cruzamento interespecífico entre *A. longicuspis* x *A. sativum*, resultou em híbridos com pareamento adequado de cromossomos na meiose, com oito bivalentes na maioria das células mães de grãos de pólen, e portanto, com grande potencial para produzir sementes (Etoh, 1985).

Posteriormente, Pooler & Simon (1993) obtiveram semente verdadeira de alho em onze dentre 150 clones de *A. solani* x *A. longicuspis*, provenientes de diferentes países, incluindo a Polônia, Brasil e a ex-União Soviética. Os bulbilhos aéreos foram removidos das inflorescências e estas foram cortadas e colocadas em recipientes com água. No período de 1988 a 1992 foram obtidas 563 sementes verdadeiras de alho, das quais cinco produziram plantas e bulbos. Os autores confirmaram ser a produção de sementes altamente dependente das condições ambientais e de ser clone-específica. Exposição a sol intenso e calor ou períodos prolongados a temperatura abaixo de 18° C reduziram a produção de forma acentuada. Aproximadamente entre 80 a 90% das sementes eram constituídas apenas dos envólucros, sem embrião ou endosperma. Já a metade das plântulas eram vigorosas, porém sofreram anormalidades durante o desenvolvimento, morrendo no estágio de 2-3 folhas.

Portanto, a carência de reprodução sexual em alho (*Allium sativum* L.) e a falta de recombinação meiótica limitam a criação de recombinantes nessa espécie, pois há somente acumulação de mutações somáticas. Esta menor variabilidade natural e a impossibilidade de reprodução por cruzamentos artificiais, faz com que o alho seja uma das espécies cultivadas com maiores limitações em se aplicar os métodos convencionais de melhoramento (Burba,

1993). Assim, as possibilidades se reduzem na aplicação de seleções sobre os materiais já existentes e, portanto, o êxito dependerá mais do que nunca da variabilidade genética existente em bancos de germoplasmas.

1.3 MARCADORES GENÉTICOS

Mesmo antes que a correlação entre um ou mais marcadores moleculares e locos genéticos que controlam características de interesse agrônomo seja estabelecida, a disponibilidade de uma bateria de marcadores moleculares, por si só, já permite empreender imediatamente uma série de estudos importantes dentro de um programa de melhoramento. De um modo geral, diversas aplicações de marcadores moleculares em melhoramento genético podem ser distribuídas em aplicações cujos resultados apresentam expectativas de curto, médio e longo prazo. As aplicações de curto prazo envolvem, basicamente, a identificação e discriminação de genótipos. Nas aplicações analíticas de médio-longo prazo, os marcadores permitem quantificar a variabilidade genética existente ao nível de seqüência de DNA e correlacioná-la com a expressão fenotípica em procedimentos de mapeamento genético. Nas aplicações sintéticas, esta informação molecular gerada na fase analítica é integrada às metodologias de seleção e recombinação de genótipos como uma ferramenta adicional para promover avanço genético (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Marcadores moleculares têm se tornado ferramentas fundamentais na construção de mapas genéticos de genomas eucariotos, e têm permitido a clonagem de genes que podem ser utilizados no melhoramento via transformação gênica. É importante ressaltar que a literatura de marcadores moleculares dispõe de um grande número de estudos de natureza analítica, porém raros são os exemplos de utilização da tecnologia na síntese de materiais melhorados. A integração efetiva de metodologias de marcadores moleculares no processo de melhoramento representa, ainda, o principal desafio na área. (Mueller e Wolfenbarger, 1999).

Apesar de apresentarem resultados que possibilitam a análise da diversidade e a vantagem de indicar o valor adaptativo dos genótipos em um determinado ambiente, características morfométricas são em geral altamente influenciadas por fatores ambientais, além de suscetíveis à pleiotropia e controle por vários genes simultaneamente. Os critérios mais práticos que se tem utilizado para agrupar tipos clonais, ou populações clonais, estão relacionados às características anatômicas e morfológicas, requerimento de frio e fotoperíodo e capacidade de emissão de haste floral (Burba e Alemany, 1988).

Os marcadores isoenzimáticos tem sido uma importante ferramenta para os estudos genéticos, sendo obtidos através de uma técnica simples, acessível e de custo relativamente baixo, pois permite análises diretas pela identificação de bandas polimórficas em gel de amido. Contudo, esses marcadores tem a desvantagem de representar uma pequena parcela do genoma, com acesso a pequeno número de locos e de alelos por loco, os quais detectam um nível de polimorfismo insuficiente entre os genótipos (Goulão *et al.*, 2001). Além de que, não oferecem uma análise direta no potencial de variação presente no genoma, são sujeitas a diferentes expressões de genes, os quais podem variar entre tecidos, e estádios de desenvolvimento.

Com o desenvolvimento da técnica de PCR, foram desenvolvidos métodos que são baseados na amplificação do DNA genômico a partir de iniciadores que detectam polimorfismo específico de fragmentos de DNA. Dentre estes, os mais conhecidos e utilizados são RAPDs (Williams *et al.*, 1990; Welsh e McClelland, 1990), e AFLPs (Vos *et al.*, 1995). Alguns estudos com estes marcadores têm sido realizados com a espécie: RAPD (Maass e Klaas, 1995; Bradley *et al.*, 1996; Al-Zahim *et al.*, 1997; AFLP (Ipek e Simon, 2001).

Marcadores RAPD têm sido utilizados no melhoramento de plantas para identificar regiões genômicas. Este marcador pode detectar rapidamente um grande número de polimorfismo genético, por isso, têm sido bastante utilizado para criação de mapas genéticos em um número significativo de espécies: *Malus domestica* (Hemmat *et al.*, 1997), *Citrus* (Cristofani *et al.*, 1999), *Vitis* (Dal Bó, 1998), *Pyrus pirifolia* (Iketani *et al.*, 2001), *Actinidia* spp (Testolin *et al.*, 2001), *Mangifera indica* (Kashkush *et al.*, 2001) e *Prunus persica* (Chaparro *et al.*, 1993).

A natureza destes marcadores RAPDs é dominante (Mueller e Wolfenham, 1999) e a sua utilização tem sido bastante atrativa por ser uma técnica bastante simplificada, de modesto custo e possibilita gerar um grande número de marcadores em pouco tempo. Esta técnica também tem a vantagem, que mesmo sem o conhecimento prévio do genoma, muito pouca quantidade de DNA por análise é requerida (Goulão *et al.*, 2001).

A técnica de AFLP (*amplified fragment length polymorphism* ou polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) é um dos mais recentes métodos de impressão digital de DNA baseado na amplificação seletiva de fragmentos de DNA clivados (Vos *et al.*, 1995). O ensaio combina a especificidade, resolução e poder de amostragem da digestão de enzimas de restrição com a velocidade e praticidade de detecção do polimorfismo via PCR (Chalhoub *et al.*, 1997). Entretanto, a enzima de restrição a ser utilizada e o número e natureza

seletiva dos nucleotídeos podem variar, dependendo da complexidade do genoma de DNA (Vos *et al.*, 1995; Zebeau, 1993).

O método permite uma co-amplificação específica de um grande número de fragmentos de restrição. O número de fragmentos que podem ser analisados simultaneamente, entretanto é dependente dos sistemas de resolução utilizados. Tipicamente 40-100 fragmentos são amplificados e detectados em gel de poliacrilamida (Vos *et al.*, 1995).

O grande número de locos, revelando um grande polimorfismo, produz uma alta complexidade de impressões de DNA, a qual pode ser utilizada para análise da diversidade genética (Ipek e Simon, 2001). A vantagem que mais destaca este marcador dos demais é indiscutivelmente, o grande número de fragmentos que são gerados e resolvidos em um único gel. Esta característica também é chamada de “índice de multiplex do ensaio AFLP”, ou seja, o número de marcadores simultâneos analisados (Peleman *et al.*, 1995). A principal desvantagem do AFLP é a dificuldade em discriminar o heterozigoto dos homozigotos. Entretanto, por causa da facilidade e rapidez com que é realizado, e a alta resolução, o AFLP é emergente como uma poderosa ferramenta molecular em estudos de discriminação de genótipos, mapeamento e evolução (Müeller e Wolfenbarger, 1999).

A justificativa para a utilização destes marcadores moleculares está baseado na necessidade de se complementar os estudos com marcadores morfológicos e isoenzimáticos, aqui propostos, para a caracterização genética do alho. Portanto, o emprego destas técnicas será complementar para criação e seleção de novos genótipos. A aplicação rotineira destes marcadores capacitaria de uma forma segura e correta a caracterização genotípica de populações de alho e outras espécies, acelerando o processo de seleção, reduzindo avaliações e aumentando a eficiência de seleção.

1.4 MARCADORES GENÉTICOS NA ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Allium sativum* L.

Os conhecimentos atuais existentes sobre a diversidade genética do alho são resultantes principalmente de trabalhos realizados a partir de análise de características morfológicas e utilizando-se marcadores bioquímicos isoenzimáticos, mas pouco se desenvolveu para a utilização de marcadores baseados na análise direta da molécula de DNA. A grande maioria dos estudos de diversidade genética de genótipos de alho no Brasil foram realizados com marcadores morfológicos e isoenzimáticos, com pequeno número de acessos, e pouco eficientes na detecção de polimorfismo (Siqueira *et al.*, 1985, Augustin e Garcia,

1993. Comparando 58 clones nacionais com 15 oriundos da Iugoslávia, Estados Unidos e França, Siqueira *et al.* (1985) evidenciaram nestes maior variabilidade genética. Os autores conseguiram diferenciar apenas dois grupos de clones nacionais com base em quatro sistemas enzimáticos estudados sugerindo no entanto, a necessidade do uso de mais marcadores. Augustin & Garcia (1993) detectaram através de classificação isoenzimática e morfológica elevado grau de similaridade genética em cultivares de alho de maior expressão no Sul do Brasil. Em outro estudo com 89 acessos de alho, Menezes Sobrinho *et al.* (1999), utilizaram 27 variáveis de caracteres morfológicos e obtiveram treze grupos de genótipos. No mesmo estudo, as variáveis que mais contribuíram para distinção morfológica dos grupos, através de análise de componentes principais, foram: altura de plantas aos 90 dias; cor dos bulbos; número de bulbilhos por bulbo e peso médio de bulbos na colheita.

Estudos de diversidade genética em clones de cebola e alho com vários sistemas enzimáticos também foram realizados por Maass e Klaas (1995). No entanto, detectaram baixo nível de polimorfismo, sugerindo que as isoenzimas são pouco informativas para descrever a variabilidade genética dessas espécies. Ipek e Simon (2001) comparando os marcadores AFLP, RAPD e Isoenzimas, detectaram as seguintes correlações: 0,96 entre AFLP e RAPD; 0,55 entre AFLP e Isoenzimas e 0,57 entre RAPD e Isoenzimas. No mesmo estudo, a comparação de dendogramas gerados a partir de AFLP e RAPD, indicou concordância elevada entre os dois marcadores que agruparam com uma correlação de 0,96. Concluem que, embora todos os marcadores estudados fossem informativos, a análise de AFLP gerou 183 padrões de bandas polimórficas com tamanho de fragmentos variando de 67 a 457 pares de base, com isso, detectando polimorfismo com maior eficiência em relação aos outros marcadores genéticos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral, avaliar o grau de diversidade genética existente entre todos os acessos de alho que compõem o Banco Ativo de Germoplasma do Estado de Santa Catarina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

São objetivos específicos desta pesquisa:

- 1) Adaptar um protocolo para extração de DNA de *Allium sativum*;
- 2) Identificar novos sistemas isoenzimáticos pra caracterização genética de *Allium sativum*;
- 3) Adaptar protocolos de técnicas moleculares RAPDs e AFLPs para *Allium sativum*;
- 4) Estimar índices de diversidade e de similaridade genética entre os acessos;
- 5) Identificar acessos duplicados através de análise de similaridade genética;
- 6) Identificar os descritores mais eficientes na discriminação de genótipos de alho.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 GERMOPLASMA AMOSTRADO

O Banco Ativo de Germoplasma de alho (BAG Alho) está instalado na Epagri/Estação Experimental de Caçador-SC, local cujas coordenadas geográficas são as seguintes: Latitude Sul, 26° 46' 32''; Longitude Oeste, 51° 00' 50''; Altitude ~ 950 metros.

As coletas dos acessos crioulos (variedades cultivados há vários anos na mesma propriedade) foram iniciadas pela Epagri no ano de 1999, em 48 municípios das regiões Norte, Alto Vale do Itajaí, Oeste e Meio Oeste do Estado de Santa Catarina, e em dois municípios do Estado do Paraná. Após a coleta, encerrada no ano de 2001, os materiais foram plantados separadamente, em parcelas compostas de 10 (dez) plantas por acesso, de modo a preservar a identidade e possibilitar um acompanhamento e avaliação dos mesmos.

O Banco Ativo de Germoplasma amostrado é formado pelos seguintes acessos: Variedades crioulas nacionais (76 acessos); Variedades cultivadas nacionais (9 acessos); Variedades cultivadas Argentinas (3 acessos); Variedades cultivadas Chinesas (5 acessos), Variedades cultivadas Mexicana (1 acesso) e Variedade cultivada Russa (1 acesso), além de um acesso da espécie *Allium ampeloprasum*. Algumas variedades comerciais nacionais são cultivadas há mais de 25 anos em Santa Catarina e em outras regiões produtoras do país, já as variedades estrangeiras, foram introduzidas no Brasil no decorrer dos últimos trinta anos, sendo que algumas delas já são cultivadas comercialmente no país.

Assim, 96 acessos foram tomados para o presente estudo.

3.2 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

Para caracterização genética, foram empregados quatro diferentes tipos de marcadores: morfológicos, isoenzimas, RAPD e AFLP.

3.2.1 Caracterização Morfológica (*Descritores Morfológicos*)

A caracterização foi realizada com base em descritores mínimos estabelecidos pelo IPGRI (*International Plant Genetic Resources*, 2001). As observações foram efetuadas aos 100 dias após o plantio, durante a estação de cultivo de 2002, em amostras compostas por 10

plantas por acesso e foram utilizados os seguintes parâmetros para a caracterização das amostras: 1) altura de plantas, medida desde o nível do solo até o ápice da folha de maior comprimento; 2) comprimento da 4ª folha; 3) largura da folha, medida na região mediana da 4ª folha; 4) número total de folhas verdes; 5) ângulo de inserção das folhas com o pseudocaule; 6) peso de bulbos; 7) número de bulbilhos por bulbo; 8) formato transversal do bulbo, variando de 1 a 3 (1= chato, 2= codiforme, 3= circular); 9) posição do disco basal, variando de 1 a 3 (1= proeminente, 2= fundido, 3= em nível); 10) forma de distribuição dos bulbilhos no bulbo, variando de 1 a 3 (1= regular multi-conchas, 2= regular dupla élice, 3= regular radial multi-dentado); 11) cor da túnica dos bulbos, classificados com notas de 1 a 3 (1= branco, 2= pérola, 3= branco-arroxeadado); 12) cor da túnica dos bulbilhos, variando de 1 a 3 (1= pérola, 2= rosado, 3= roxo); 13) formação de haste floral, variando de 1 a 4 (1= ausente, 2= baixa, 3= média, 4= alta); 14) presença de bulbilhos aéreos, variando de 1 a 2 (1= ausente, 2= presente); 15) densidade foliar, variando de 1 a 3 (1= baixa, 2= média, 3= alta); 16) arquitetura da planta, (porte) variando de 1 a 3 (1= ereta, 2= semi-ereta, 3= decumbente) e 17) ciclo da planta, sendo classificado com precoce (4 a 4,5 meses); ciclo médio (4,6 a 5,5 meses) e tardio (acima de 5,6 meses).

Para analisar os dados foi aplicado as técnicas de análise de agrupamento e Análise de Componentes Principais para distinção de grupos de germoplasma em diferentes conglomerados e para determinação das variáveis mais importantes na discriminação de grupos. Antes da aplicação desses procedimentos estatísticos, as variáveis foram estandardizadas para eliminação do efeito das unidades.

As análises foram realizadas empregando-se o programa XLSTAT, versão 7.0/2003 (<http://www.xlstat.com/demoe.htm>), acessado em 20/02/2004.

3.2.2 Eletroforese de Isoenzimas

3.2.2.1 Obtenção das Amostras Foliares

Foram testados dois tipos de tecidos: folha e raiz. Amostras de 96 acessos do Banco Ativo de Germoplasma da Epagri/Estação Experimental de Caçador-SC foram coletadas e submetidas a extração de proteínas e separação através de eletroforese.

3.2.2.2 Preparação do Gel e Soluções Tampões Gel/Eletrodo

Empregou-se a técnica de eletroforese de isoenzimas em gel de amido de milho (Penetrose 30; Refinações de Milho, Brasil LTDA, Mogi Guaçu-SP), 13% (p/v), pesando-se 39 g de penetrose para um volume de 300 ml de solução tampão. A solução foi aquecida em forno microondas e após a dissolução do amido, foi vertida em formas de acrílico horizontal. Assim que atingisse a temperatura ambiente, o gel foi coberto com uma placa de vidro e levado para a geladeira, onde permaneceu até a sua utilização. Foram testados duas soluções tampões eletrodo/gel (Tabela 1).

Tabela 1. Sistemas de tampão eletrodo/gel, testados em *Allium sativum* (Florianópolis-SC, CCA/UFSC, 2003).

DENOMINAÇÃO	TAMPÃO ELETRODO	TAMPÃO GEL	REFERÊNCIA
Tris-Citrato (TC)	Tris (0,233 M) Ácido cítrico (0,086 M) (pH 7,5)	Diluição a 3,5% do tampão eletrodo	Afenas <i>et al.</i> , 1991
Citrato morfolina (CM)	Ácido cítrico 7,68 g/l Morfolina (pH 6,1)	Diluição 1:20 do tampão eletrodo	Cheliack e Pittel, 1984

A extração das isoenzimas foi realizada em tecido fresco em placas de louça adicionando-se duas gotas de solução extratora constituída de 2,6mM Bissulfito de sódio, 2,5 mM de borato de sódio, 5,8mM de DIECA, 3 mM de DTT, 0,034 M Fosfato de sódio bibásico, 5,7 mM L-ácido ascórbico, 0,2% (v/v) 2-mercaptoetanol, 1% (p/v) polietilenoglicol 6000, 2,56% (p/v) PVP 40 e 20 mM sacarose (Alfenas *et al.*, 1991), 10 mg de polivinilpirrolidone (PVP) e 30 mg de areia lavada (24 h em água corrente, 24 h em ácido sulfúrico e 24 h em água corrente).

O gel e os tampões foram previamente resfriados a 4^oC antes do uso. Após a maceração das amostras com a solução extratora, essas foram aplicadas no gel através de tiras de papel filtro, deixando-se um espaço entre amostras no gel de 3 mm. Foram adicionados nas laterais de cada gel, papéis embebido em solução de azul de bromofenol, utilizado como indicador da migração das proteínas. O aparato contendo gel foi apoiado sobre duas cubas contendo a solução tampão do eletrodo. Foi utilizado como ponte de ligação entre o gel e

tampão de eletrodo pano tipo perfex duplo. As tiras de papel filtro foram retiradas após 20 minutos de corrida.

Durante o período de migração os géis foram mantidos à temperatura de aproximadamente 5⁰C. O gel foi submetido a uma corrente constante 100 volts e amperagem constante de 20 mA durante os primeiros 20 minutos. No final deste período, após a remoção dos papéis filtro, a voltagem foi elevada para 200 volts e a amperagem para 40 mA durante 1 h. Seguiu-se a corrida com 300 volts e manteve-se a amperagem em 40 mA durante duas a três horas, ou até que o marcador azul de bromofenol atingiu 8 cm de migração. O tempo de duração de uma corrida foi de aproximadamente 4 horas em média.

Duas horas antes do término da corrida, foram pesados os reagentes e os cofatores para serem misturados minutos antes da coloração. O gel foi removido das cubas e com auxílio de um fio de nylon, cortado horizontalmente em 6 fatias de aproximadamente 1,5 mm de espessura. Apenas cinco fatias foram usadas para a colorimetria com o descarte da primeira fatia. As fatias foram colocadas em travessas de porcelanas, sobre as quais foi adicionado uma solução contendo componentes necessários para a coloração de cada enzima específica.

As travessas de porcelanas foram colocadas em estufa a 37⁰C até que ocorresse a revelação, tempo que variou de 30 minutos a 12 horas dependendo do sistema isoenzimático. Após o aparecimento das bandas, retirou-se a solução e lavou-se o gel com água destilada. Só então foi feita a interpretação dos géis.

Foram testados 21 sistemas isoenzimáticos nas diferentes camadas do gel (Tabela 2), empregando-se receitas descritas por Alfenas *et al.* (1991).

Tabela 2. Sistemas enzimáticos (coloração) testados para eletroforese de isoenzimas em *Allium sativum* L. (Florianópolis-SC, CCA/UFSC, 2003).

Enzima	Código	Sigla
Fosfoglucoose Isomerase	EC 5.3.1.9	PGI
Malato Desidrogenase	EC 1.1.1.37	MDH
Fosfoglucomutase	EC 5.4.2.2	PGM
Xiquimato Desidrogenase	EC 1.1.1.25	SKDH
Peroxidase	EC 1.11.1.7	PRX
Isocitrato Desidrogenase	EC 1.1.1.42	IDH
Álcool Desidrogenase	EC 1.1.1.1	ADH
Fosfatase Ácida	EC 3.1.3.2	ACP
Glutamato Desidrogenase	EC 1.4.1.2	GTDH
Glucose 6-Fosfato Desidrogenase	EC 1.1.1.49	G6PDH
Alfa-Esterase	EC 3.1.1.1	α -EST
Beta-Esterase	EC 3.1.1.1	β -EST
Enzima Málica	EC 1.1.1.40	ME
Manitol Desidrogenase	EC 1.1.1.67	MADH
Leucina Aminopeptidase	EC 3.4.11.1	LAP
Glutamato Oxaloacetato Transaminase	EC 2.6.1.1	GOT
Superoxido Dismutase	EC 1.15.1.1	SOD
Glucose Desidrogenase	EC 1.1.1.47	GDH
Glicerato 2-Desidrogenase	EC 1.1.1.29	G2DH
6-Fosfogliconato Desidrogenase	EC 1.1.1.44	6PGDH
Fosfatase Alcalina	EC 3.1.3.1	ALP

Após a revelação das enzimas, foi realizada a interpretação dos zimogramas, considerando a estrutura quaternária da enzima e, posteriormente, definido o genótipo de cada acesso estudado. A interpretação dos zimogramas foram realizadas baseando-se na distância de migração de cada fragmento, convencionando-se o alelo 1 como o mais freqüente e os

demais por ordem de maior distância de migração. Além disso, fotografou-se os géis, que serviram como documentação permanente da espécie em estudo.

Foi obtido os valores da mobilidade relativa (Rf) de cada banda, conforme citado por Ferraz *et al.* (1994), onde:

$$Rf = Di / db \times 100$$

Sendo:

Rf = migração relativa ao marcador bromofenol;

Di = distância da origem à banda em questão;

Db = distância da origem até a posição média do do marcador de bromofenol.

3.2.2.3 Análise dos Dados

A partir da interpretação dos zimogramas, foram calculadas, para os 20 acessos, as freqüências alélicas, e os índices básicos de diversidade: porcentagem de locos polimórficos, número médio de alelos por loco e heterozigosidade. As estimativas de similaridade genética entre os acessos foram obtidas através das estimativas não viesadas de Nei (1978).

a) Freqüências Alélicas

As freqüências alélicas foram estimadas empregando-se o programa BIOSYS-2 (Swofford & Selander, 1989), conforme:

$$\hat{p}_{ij} = n_{ij} / n_j$$

sendo:

^

\hat{p}_{ij} = freqüência do alelo i na população j;

n_{ij} = número de ocorrências do alelo i na população j;

n_j = número total de alelos amostrados na população j.

b) Índices de Diversidade

A porcentagem de locos polimórficos (P) foi estimado dividindo-se o número de locos polimórficos pelo número total de locos estudados.

$$P = (\text{n}^\circ \text{ de locos polimórficos} / \text{n}^\circ \text{ total de locos}) \times 100$$

Um loco foi considerado como polimórfico para cada grupo estudado (acesso) quando a frequência do alelo mais comum não ultrapassou 95% Nei (1987).

O número médio de alelos por loco (A) foi estimado dividindo-se o número de alelos em todos os locos pelo número total de locos estudados.

$$A = \sum k_i / r$$

Onde:

$\sum k_i$ = somatório do número de alelos em cada loco

r = número de locos

A heterozigosidade observada (H_o) foi obtida pela média entre os locos do número de indivíduos heterozigotos dividido pelo número de indivíduos amostrados (Nei, 1973).

$$H_o = [(\sum p_{ij}) / n] / l$$

Onde:

$(\sum p_{ij})$ = somatório dos heterozigotos (i # j);

n = número total de indivíduos;

l = número de locos.

A heterozigosidade esperada (H_e) foi obtida empregando-se o estimador não viesado de Nei (1978):

$$H_e = 2n(1 - \sum p_i^2) / (2n - 1) = n_{ij} / n_j$$

Sendo:

^

P_i = frequência do alelo i.

As estimativas de P, A, H_o e H_e foram obtidas empregando-se o programa BIOSYS-2 (Swofford & Selander, 1989).

C) Similaridade Genética

A similaridade genética entre os 20 acessos foi determinada através das estimativas não viesadas de Nei (1978). Para o cálculo foi empregado o programa BIOSYS-2 (Swofford & Selander, 1989).

3.2.3 Marcadores RAPD

3.2.3.1 Extração de DNA total de *Allium sativum* L.

Folhas de plantas jovens do Banco Ativo de Germoplasma da Epagri/Estação Experimental de Caçador-SC foram coletadas, acondicionadas em caixas térmicas com gelo e transportadas até o laboratório. As amostras foram mantidas a -20° C até o momento da extração.

O DNA das amostras foi extraído com base no protocolo proposto por Vieira (2002), para ameixeira. Em cadinhos de porcelana, adicionou-se 0,2 g de tecido, que foi moído em nitrogênio líquido até virar pó. Após este procedimento, acrescentou-se 700 µl de tampão de extração (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCL, pH 8,0; 1% PVP-40 e 0,2% β-mercaptoetanol). A solução CTAB forma um complexo com o DNA. Subseqüentemente, os polissacarídeos, proteínas desnaturadas e restos celulares foram removidos pela ação do clorofórmio e após a precipitação e ressuspensão em tampão TE contendo 10µg/mL de RNase, o DNA foi armazenado a -20° C até ser usado.

Para estimar a concentração de DNA extraído foi feito um gel de agarose a 0,8% corado com uma solução de 0,01% de brometo de etídeo. O gel foi carregado com 3 µl de uma solução estoque de DNA e 3 µl de Tampão de carregamento (20ml de TE, pH 8,0; 8 gr de sacarose; 50 mg de azul de bromofenol; 400 µl de brometo de etídeo (1 mg/ml) e 1µl de água mili-Q) e submetido a eletroforese a uma corrente constante de 80 volts por 1 hora e meia. Após a eletroforese o gel foi visualizado em transiluminador de luz ultra-violeta e fotografado em sistema de fotodocumentação digital mediante uso de sistema computadorizado. A quantidade de DNA obtido para cada amostra foi estimada através de comparação, tendo como padrão DNA Fago Lambda nas concentrações de 50, 100 e 200 ng/µL (Sambrook *et al.*, 1989). Após estimar a concentração de DNA, todas as amostras foram diluídas para uma concentração de 4,0 ng/µL para o estoque de trabalho.

3.2.3.2 Otimização do Protocolo de Amplificação e Resolução

Foram utilizados o DNA de 8 plantas selecionadas ao acaso entre as 96 amostras para a seleção dos iniciadores a serem utilizados na caracterização da população de alho.

Partindo-se da sugestão descrito por Willian *et al.* (1990), realizou-se a otimização da técnica testando-se diferentes volumes de reação, 13 μL , 20 μL e 25 μL e diferentes concentrações de magnésio (2,0; 2,5 e 3,0 mM), de iniciadores (0,3 e 0,4 μM), de dNTPs (0,2 e 0,4 mM), DNA (5, 8, 12 e 15 ng), e a presença ou não de BSA (0,8 mg/mL). O programa de PCR foi o mesmo utilizado por Al-Zahim *et al.* (1999): desnaturação do DNA a 95° C por 3 minutos seguida por 45 ciclos de 1 min a 94° C, 1 min a 35° C, 2 min a 72° C com um passo final de extensão de 5 min a 72° C. Sessenta iniciadores RAPD de 10 pares de bases (Operon Technologies) foram testados para identificação de marcadores polimórficos. As reações de PCR foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.). Após a otimização do protocolo as seqüências de DNA das 96 amostras foram submetidas a reação de amplificação e resolução. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% contendo 3 μL de brometo de etídeo e submerso em tampão TBE 1X (tris-Cl 20 mM, ácido bórico 2 M e EDTA 20 mM) sob corrente elétrica constante de 120 volts. Após a eletroforese, as bandas foram visualizadas sob luz ultra-violeta e fotodocumentadas, conforme descrito no item 4.2.3.1. Utilizou-se marcador de 1 Kb como marcador padrão.

Para cada análise, um mesmo DNA foi desafiado duas vezes com mesma reação. Somente foram consideradas as bandas que reproduzidas nas duas reações.

3.2.3.3 Análise da Diversidade Genética

Após um *screening* repetido com sessenta iniciadores RAPD de seqüência arbitrária, dez deles foram selecionados para proceder a análise da diversidade genética entre os acessos. A partir dos padrões de banda dos 96 acessos gerados pelos RAPDs selecionados, foi construída uma matriz binária, e analisou-se a presença ou ausência de cada banda, codificada por “1” ou “0”, respectivamente. Partindo-se dessa matriz, foi determinado o índice de similaridade de Jaccard entre todos os acessos sendo posteriormente agrupados pelo método UPGMA (método das médias das distâncias). A análise dos dados e construção do dendograma foi feita com auxílio do programa NTSYS-pc 2.02 (Rohlf, 1990).

3.2.4 Marcadores AFLP

3.2.4.1 Adaptação do Protocolo Prara Marcadores AFLP

O DNA foliar de 5 plantas do Banco Ativo de Germoplasma, selecionado ao acaso entre os 96 acessos, foi utilizado para otimização do protocolo AFLP. O DNA utilizado para otimização do protocolo e reações de amplificação foram os mesmos extraídos para análise de marcadores RAPD.

As reações de AFLP, conforme descrito por Vos *et al.* (1995), foram realizadas utilizando-se o Kit AFLP[®] Analysis System I (Invitrogen[®]). Após a digestão com as enzimas *EcoRI* e *MseI* e ligação dos oligonucleotídeos adaptadores, o DNA foi amplificado (pré-amplificação) utilizando-se iniciadores com uma base seletiva (*EcoRI*-A e *MseI*-C) em volume de 50 µL. Após essa etapa, o DNA pré-amplificado foi diluído para um volume de 1:50, e amplificado utilizando-se iniciadores *EcoRI* e *MseI* com três bases seletivas. Visando otimizar as reações nessa etapa, os iniciadores *EcoRI* foram testados com diluição: 0,25 e 0,50µL e sem a diluição recomendada pelo fabricante: 0,25, 0,35 e 0,50 µL por reação. Todas essas etapas foram realizadas através dos seguintes procedimentos: restrição enzimática (2 h a 37° C seguidos de 15 minutos a 70° C), ligação dos adaptadores (2 h a 20° C), reação de pré-amplificação (94°C a 30 segundos; 56°C a 60 segundos; 72°C a 60 segundos). A reação de amplificação foi realizada utilizando ciclos descritos no manual do Kit. Todas as reações foram realizadas em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.). O processo de definição do protocolo foi realizado testando-se 24 combinações de iniciadores *EcoRI* e *MseI* do Kit, combinados aleatoriamente, sendo posteriormente selecionados para os estudos de diversidade genética do alho a partir das condições otimizadas neste protocolo.

Os produtos da amplificação foram visualizados após a eletroforese em gel desnaturante de 6% de poliacrilamida em aparato vertical modelo S2 (Life Technologies) utilizando tampão TBE 1X (Tris-CL 20 mM, ácido bórico 2M e EDTA 20 mM) nas cubas inferior e superior e a adição de acetato de sódio 0,35 M na cuba inferior. O gel foi previamente aquecido até aproximadamente 50° C (pré-corrída) com potência constante de 60 W. As amostras de DNA, juntamente com o marcador Ladder de 10 pares de bases, foram desnaturadas por 5 minutos a 94° C e a eletroforese realizada com potência constante de 60W durante 2 horas ou até que o marcador ficasse a 3 cm da extremidade inferior da placa de vidro.

Para a coloração dos géis com nitrato de prata foi utilizado o protocolo descrito por Creste *et al.* (2001), com alguns ajustes nos tempos de exposição do gel nas soluções. O protocolo ajustado baseia-se na fixação do DNA amplificado com solução de etanol 10% + ácido acético 1% por 10 minutos, pré-tratamento com ácido nítrico 1,5% por 30 segundos, impregnação com solução de nitrato de prata 0,2% por 35 minutos na ausência de luz, revelação com carbonato de sódio 3% + formaldeído 37% até a completa visualização das bandas e finalizado com um bloqueio em solução de ácido acético 5% por 3 minutos. Entre cada etapa do processo o gel foi lavado 1 vez em água destilada por 20 segundos.

Após a coloração dos géis com prata, os mesmos foram avaliados visualmente sob transiluminador de luz branca e, posteriormente, registrados por meio de scanner. Para cada análise, um mesmo DNA foi desafiado duas vezes com mesma reação. Somente foram consideradas as bandas que reproduzidas nas duas reações.

3.2.4.2 Análise da Diversidade Genética

Três combinações (E-ACG + M-CAG, E-ACT + M-CTA, E-ACG + M-CAT) foram selecionadas para proceder a análise da diversidade genética dos 96 acessos. Os índices de diversidade determinados bem como os métodos utilizados, foram os mesmos utilizados para os marcadores RAPD.

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Para não correr o risco de utilizar-se um eixo componente principal do qual não existe a certeza se este representa ou não uma variância fatorial, serão utilizados para análise e interpretação, apenas os três primeiros eixos que acumulam juntos uma variância total de 63,4%, conforme é visto na Tabela 3.

Tabela 3. Variância cumulativa dos eixos componentes principais (ECP), utilizados na análise de caracterização dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de alho de Santa Catarina (Florianópolis-SC, CCA/UFSC, 2003).

	ECP 1	ECP 2	ECP 3
Variância (%)	29,4	20,9	13,1
Variância cumulativa	29,4	50,4	63,4

Os descritores morfológicos utilizados na análise de componentes principais e suas respectivas contribuições para formação dos eixos, estão representados na tabela 4. Os dez descritores morfológicos de maior importância para formação destes eixos foram: a cor da túnica do bulbo (CTB), densidade foliar (DFO), arquitetura da planta (ARQ), forma de distribuição dos bulbilhos no bulbo (FDB), presença de bulbilhos aéreos (PBA), largura da 4ª folha verde (LFO), cor da túnica dos dentes (CTD), peso de bulbo (PBU), formato transversal do bulbo (FTB) e altura da planta.

Tabela 4. Contribuição absoluta e coeficientes de correlação com cada eixo principal, dos descritores utilizados na caracterização morfológica dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma de alho por Análise de Componentes Principais (Florianópolis-SC, CCA/UFSC, 2003).

Descritores	ECP 1	ECP 2	ECP 3
CTB	11,1 (-0,724)	2,9 (-0,315)	4,7 (-0,314)
DFO	11,8 (0,742)	5,4 (-0,424)	1,7 (-0,187)
ARQ	16,0 (0,867)	0,3 (-0,104)	2,8 (-0,244)
FDB	5,4 (0,503)	17,8 (0,767)	0,5 (-0,104)
PBA	3,0 (0,373)	19,2 (0,891)	6,5 (0,371)
LFO	1,5 (0,287)	1,8 (-0,252)	20,2 (0,652)
CTD	0,3 (0,114)	6,4 (0,468)	16,5 (0,588)
PBU	0,0 (0,011)	5,4 (-0,424)	0,3 (0,081)
FTB	2,3 (-0,331)	0,0 (-0,005)	0,9 (0,138)
APL	7,6 (0,601)	8,1 (-0,520)	13,0 (0,522)
CFO	10,8 (0,715)	5,6 (-0,434)	9,3 (-0,442)
NFO	2,4 (-0,339)	0,7 (-0,151)	12,9 (0,522)
AFO	8,6 (0,637)	0,3 (0,109)	5,7 (-0,335)
NDB	10,8 (-0,715)	0,3 (0,108)	0,1 (0,041)
PDB	3,2 (0,392)	11,8 (-0,630)	0,7 (-0,125)
HFL	5,1 (0,492)	13,8 (0,681)	3,9 (0,289)

* Os valores entre parênteses representam as correlações dos descritores com os eixos componentes principais.

O primeiro e segundo componentes principais que representam, aproximadamente, 50% do total da variação, foram tomados para a análise de interpretação, e estão representados graficamente na Figura 1. Os descritores morfológicos arquitetura de planta (ARQ), ângulo da folha com o pseudo-caule (AFO), número de dentes por bulbo (NDB) e cor da túnica do bulbo (CTB) tiveram uma contribuição significativa com o eixo componente principal I (ECP-I) apresentando valores elevados de correlação com este eixo, 0,867, 0,637, -0,715 e -0,724, respectivamente. Já os descritores forma de distribuição dos bulbilhos no bulbo (FDB), presença de bulbilhos aéreos (PBA), cor da túnica dos dentes (CTD) e posição do disco basal (PDB) tiveram contribuição mais significativa com o eixo componente principal II (ECP-II), apresentando valores de correlações com este eixo da ordem de 0,767, 0,891, 0,468 e -0,630 (Tabela6).

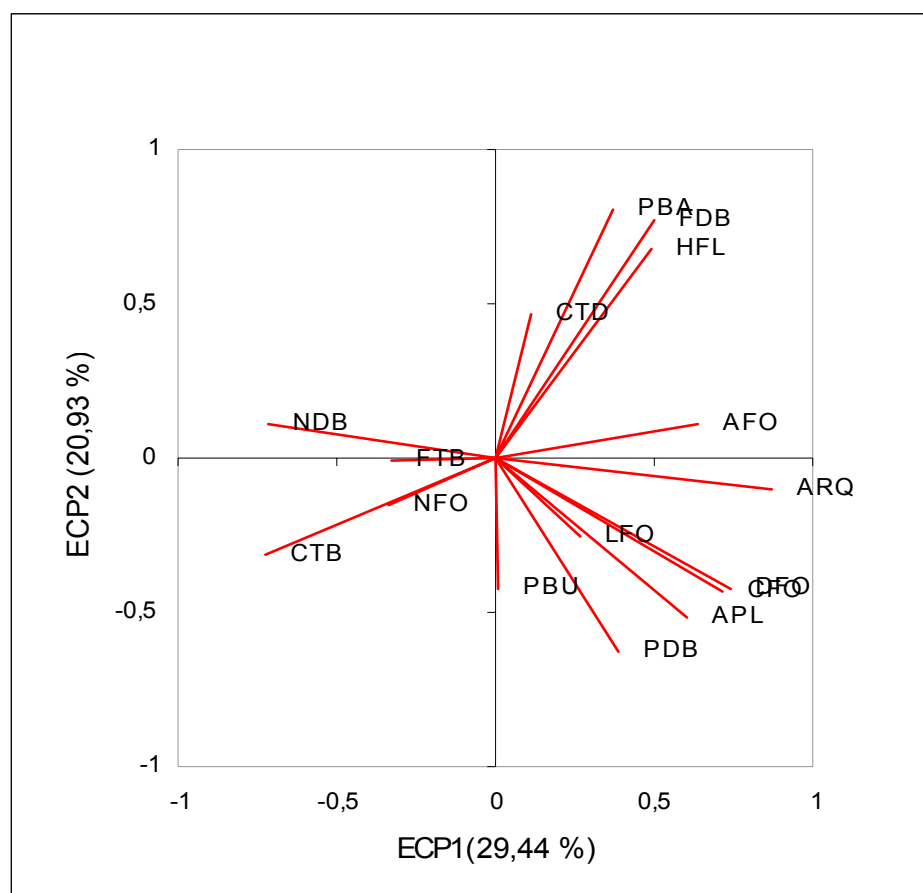


Figura 1. Representação gráfica dos descritores (1 a 16) no espaço dos componentes principais I e II, representando juntos 50,4% da variação total dos dados (Florianópolis-SC, CCA/UFSC, 2003).

A representação gráfica da Figura 2, onde estão plotadas as variáveis e amostras, informa em média, o valor do descritor para a amostra, e revela também a formação de diferentes conglomerados de acessos. No entanto, uma análise mais conclusiva dos grupos formados, ficou prejudicada, devido a impossibilidade de identificar os acessos, principalmente os crioulos, em função do grande número de amostras plotadas no gráfico. Mesmo assim, foi possível identificar a formação de quatro grupos distintos no gráfico da Figura 2: No alto e a direita do ECPII, formou-se um grupo com oito cultivares nacionais, mostrando uma alta correlação com os descritores cor da túnica do bulbo (CTD), presença de bulbilhos aéreos (PBA) e forma de distribuição dos bulbilhos (FDB). A direita do gráfico e logo abaixo do ECPI, formou-se um grupo com apenas a cultivar Rei, correlacionado fortemente com o descritor arquitetura da planta (ARQ). Mais abaixo desse grupo, ainda a direita do gráfico, observa-se a formação de um grupo com dez acessos de alho crioulo, mostrando uma forte correlação desses com os descritores densidade foliar (DFO) e largura

das folhas (LFO). Mais ao centro do gráfico observou-se a formação do maior grupo, também de acessos crioulos, fortemente correlacionado com os descritores formato transversal do bulbo (FTB) e cor da túnica do bulbo (CTB). Neste grupo, inclui-se ainda, a cultivar Gigante. As amostras dispersas no gráfico representam as cultivares introduzidas de outros países.

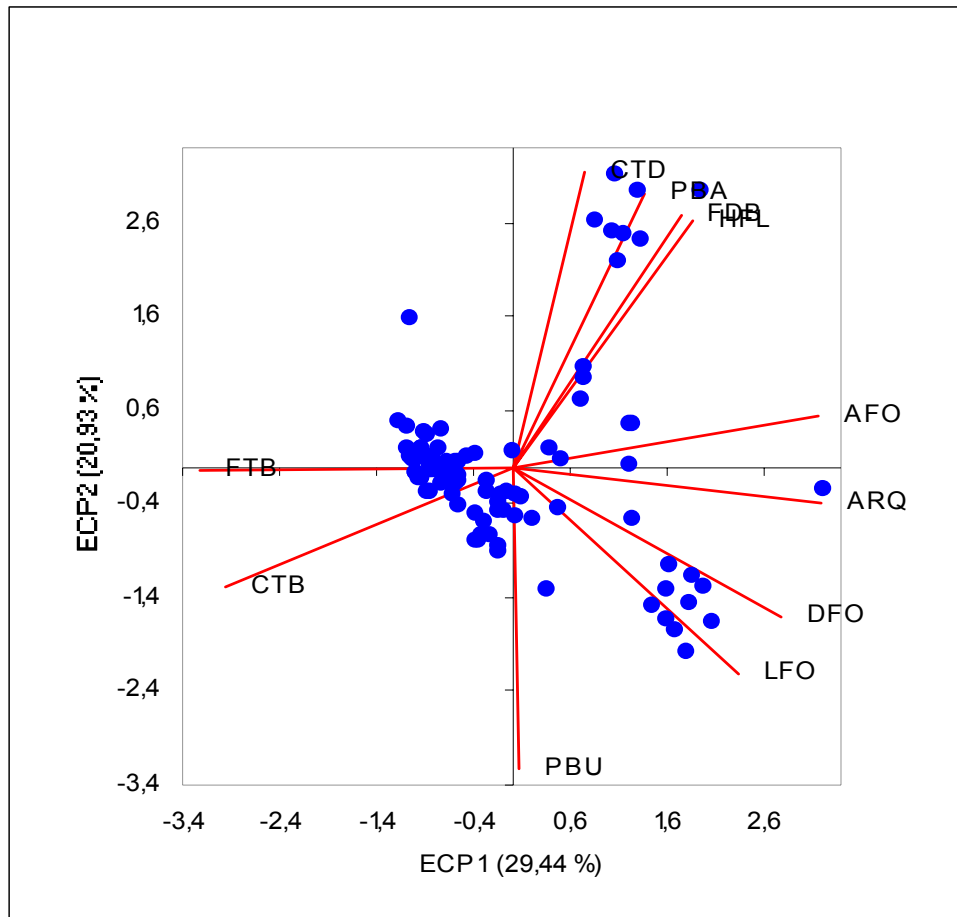


Figura 2. Representação gráfica dos descritores e amostras no espaço dos componentes principais I e II, representando juntos 50,4% da variância total dos dados (Florianópolis-SC, CCA/UFSC, 2003).

Na análise de agrupamento, tomando-se os valores de uma matriz de correlação, gerada a partir dos dados originais, foi construído um dendograma que está apresentado na Figura 3. Formaram-se dois grandes grupos, um com 29 e o outro com 67 acessos. O grupo com maior número de acessos contém quatro subgrupos, considerando-se o nível de 30% de similaridade genética, incluindo 66 dos 76 acessos crioulos. Este grupo inclui apenas uma variedade recomendada para cultivo, a cv Gigante, oriunda de seleção de plantas de variedades crioulas (Biasi, 1998 - informação pessoal).

O segundo grupo contém três subgrupos, também no nível de 30% de similaridade genética. Um destes subgrupos é formado exclusivamente por acessos crioulos, sendo os outros dois formados pelas variedades recomendadas para cultivo.

Na geração do dendograma referido, foram utilizados todos os 16 descritores propostos, inclusive os de menor importância, detectados pela análise de componentes principais. Alternativamente, utilizando-se apenas os descritores de maior valor para discriminar os acessos crioulos, na análise de componentes principais (Figura 2), entre eles o formato transversal do bulbo (FTB), cor da túnica do bulbo (CTB) e largura da folha (LFO), e considerando a experiência de avaliações anteriores, realizadas pela Epagri de Caçador, (Mueller *et al.*, 2001 e 2002, dados não publicados), obteve-se um novo agrupamento dos acessos crioulos, coerente com aquele obtido pela Epagri, em dois anos de avaliações (Tabela 5).

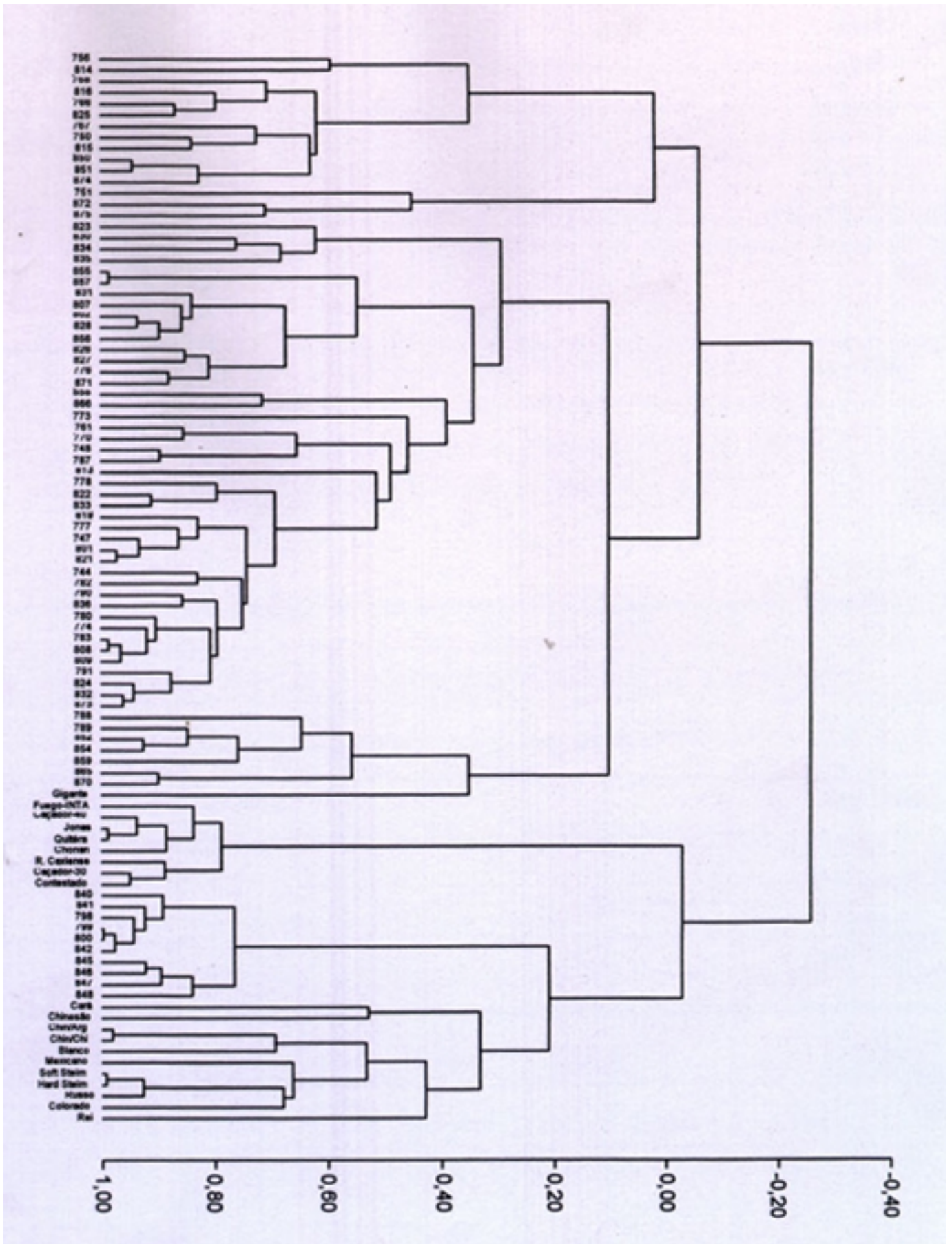


Figura 3. Dendrograma de similaridade para os acessos do Banco Ativo de Germoplasma de alho de Santa Catarina, obtido através de análise de agrupamento, empregando-se descritores morfológicos (Florianópolis-SC, CCA/UFSC, 2003).

Tabela 5. Agrupamento dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma de alho de Santa Catarina, obtido através de descritores morfológicos (Florianópolis-SC, CCA/UFSC, 2003)

Grupos	Acessos do Banco Ativo de Germoplasma de alho	Origem
I	840, 845, 798, 841, 799, 800, 842, 846, 744	Brasil-SC
II	750, 766, 767, 825, 850, 851, 872, 874, 876, 875, 815, Gigante, 768, 816, 873, 751,	Brasil-SC
III	747, 761, 782, 827, 847, 848, 440, 748, 787, 789, 801, 802, 813, 821, 824834, 836, 857, 858, 756, 773, 777, 878, 783, 437, 438, 855, 852, 808, 819, 822, 826, 828, 835, 830, 831, 774, 776, 790, 814, 823, 770, 778, 780, 856, 854, 788, 807, 832, 833, 809, 791	Brasil-SC
IV	Fuego-INTA Caçador-30, Caçador-40, Jonas Quitéria, Chonan, Roxo Caxiense, Contestado	Argentina Brasil-SC
V	Cará Chinesão	Brasil China
VI	Blanco, Colorado Chinês/Arg., Chinês/China, Soft Steim, Hard Steim Mexicano Russo	Argentina China México Rússia
VII	alho-rei	Brasil-SC

O grupo I apresenta acessos com bulbo codiforme, túnica de cor branca com estrias arroxeadas e bulbilhos rosados. A planta apresenta folhas de largura intermediária e porte semi-ereto. O grupo II é formado por acessos de bulbo circular, túnica de cor branca com estrias arroxeadas e bulbilhos arroxeados. As plantas apresentam folhas de largura intermediária e porte semi-ereto, que se dobram apenas nas extremidades. O grupo III é formado por acessos com bulbos pequenos, de formato circular, túnica de cor branca com estrias arroxeadas e bulbilhos rosados. Na Figura 4 estão apresentadas as principais características morfológicas dos bulbos e bulbilhos dos três grupos de acessos crioulos.

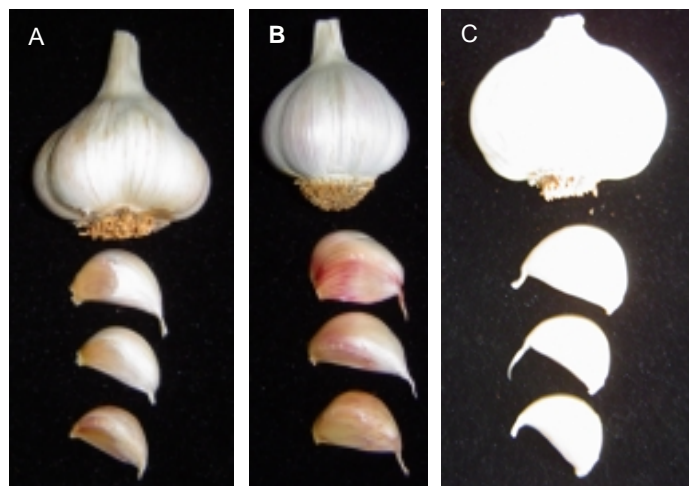


Figura 4. Características de bulbos e bulbilhos dos acessos de alho crioulo; A: bulbo e bulbilhos representativo do grupo I; B: bulbo e bulbilhos representativo do grupo II; C: bulbo e bulbilhos representativa do grupo III.

4.2 ELETROFORESE DE ISOENZIMAS

4.2.1 Sistemas Tampões Eletrodo/Gel e Coloração Testados

Após testar dois tipos de tecidos para extração da proteína, 21 sistemas enzimáticos, dois tampões eletrodo/gel e 5 camadas do gel, adotou-se como protocolo padrão o seguinte: a utilização de folhas coletadas de 30 a 40 dias após a emergência como substrato de extração de proteínas, a utilização do tampão eletrodo/gel tris-citrato (TC) e seis sistemas enzimáticos, os quais revelaram 7 locos aparentes: ACP (Fosfatase Ácida), ADH (Álcool Desidrogenase), G2DH (Glicerato-2-Desidrogenase), G6PDH (Glucose-6-Fosfato Desidrogenase), MDH (Malato Desidrogenase) e PGI (Fosfogluco Isomerase) descritos por Alfenas et al. (1991). A melhor resolução das bandas no gel foi obtida utilizando a camada 2 para o sistema ACP e para os demais sistemas não foi observado diferença entre as camadas.

Com base na estrutura quaternária referenciada na literatura (Kephart, 1990), a interpretação dos zimogramas revelou a existência de 3 alelos para PGI-1 (dimérica/polimérica), 1 alelo para PGI-2 (dimérica/monomórfica), 2 alelos para ACP (monomérica/polimórfica), ADH e G6PDH (dimérica/polimórfica), 3 alelos para G2DH (monomérica/polimórfica), MDH (dimérica polimórfica). Os padrões de variantes eletroforéticas obtidos nos 7 locos analisados foram: PGI-2, 1 padrão; G6PDH, 2 padrões; ACP, ADH e G2DH, 3 padrões; MDH e PGI-1, 4 padrões (Figura 5).

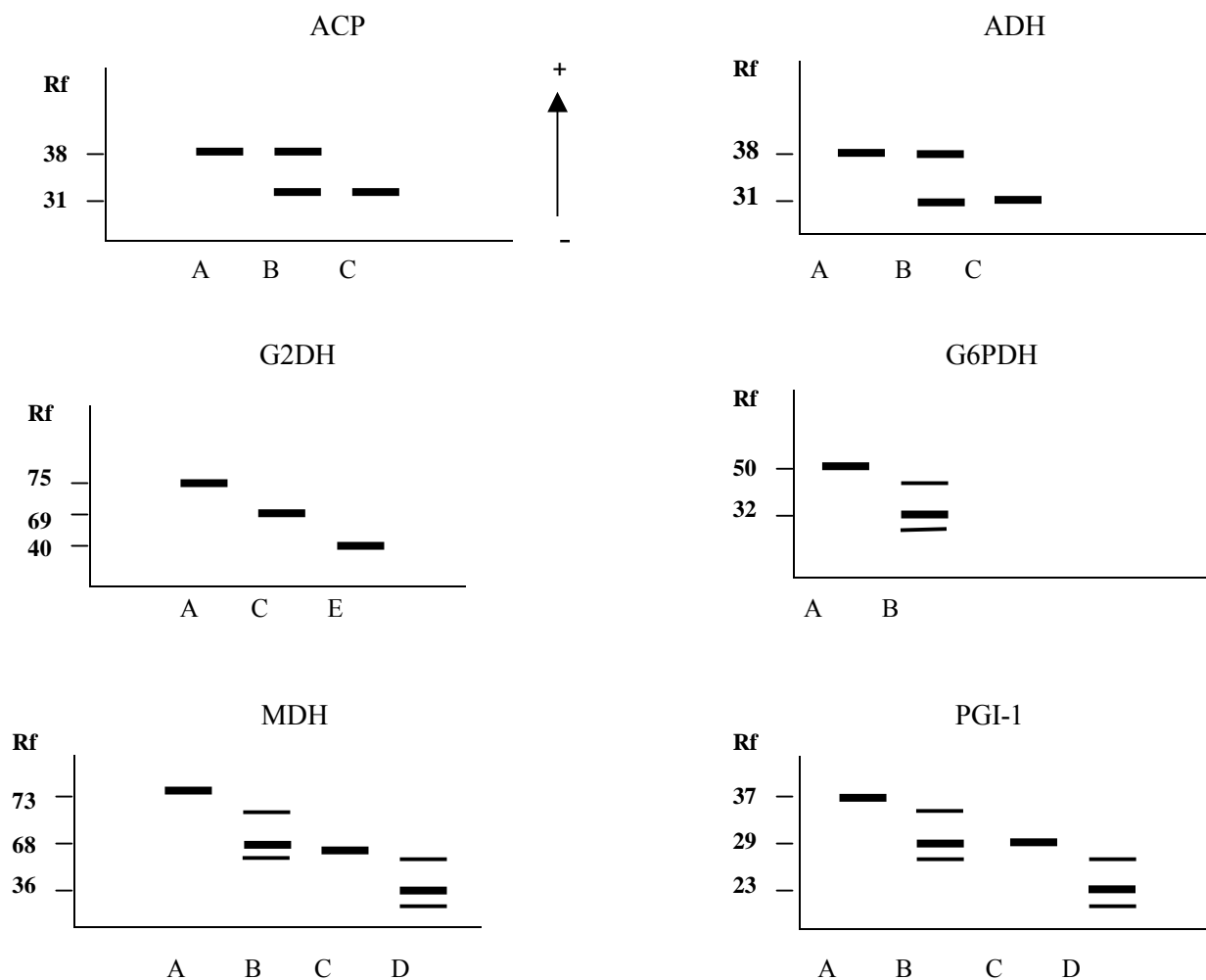


Figura 5. Padrões eletroforéticos e mobilidade relativa (Rf x 100) em acessos de alho; ACP: 3 padrões, ADH: 3 padrões, G2DH: 3 padrões, G6PDH: 2 padrões, MDH: 4 padrões, e PGI-1: 4 padrões

4.2.2 Análise da Diversidade Genética

Em função da diferença de ciclos de produção entre as variedades crioulas e as variedades comerciais, os bulbilhos dos 76 acessos crioulos, todos de ciclo precoce, foram armazenadas para serem plantadas na mesma época dos acessos comerciais, de ciclo tardio, para que a coleta de tecido vegetal fosse feita no mesmo período, ou seja, no mês de julho de 2003. Para compensar a diferença de temperatura, as variedades crioulas, que são sensíveis as baixas temperaturas de inverno na etapa inicial de crescimento, foram cultivadas em substrato contendo Agar e solução nutritiva em ambiente aclimatizado. Apesar desses cuidados, houve atraso na germinação das plantas e só após 30 dias, quando as plantas das variedades

comerciais já haviam atingido um estágio avançado de desenvolvimento no campo, é que havia material disponível dos acessos crioulos para proceder a coleta e extração das enzimas. Contudo, as bandas reveladas a partir desses tecidos apresentaram baixa nitidez praticamente em todos os sistemas testados, comprometendo a análise desses 76 acessos.

Com isso, a caracterização genética com o uso de marcadores isoenzimáticos foi realizada apenas nos 20 acessos comerciais, amostrados no campo 30 dias após o plantio, período em que já não mais havia disponibilidade de material vegetativo dos acessos crioulos na lavoura pois, devido ao ciclo de produção, sua colheita já havia sido efetuada.

As frequências alélicas entre os 20 acessos estudados apresentaram valores que variam de 0,050 a 0,950. Nos sistemas G2DH, MDH e PGI-2 foram identificados três alelos, por outro lado, os demais sistemas exibiram apenas dois alelos. Para cada loco considerou-se o alelo 1 como o de maior ocorrência e os demais alelos por ordem decrescente de migração no caso de locos com dois ou três alelos.

Entre os 20 acessos o percentual de locos polimórficos (P) variou de 0 a 57,1, sendo o valor médio 13,6% (Tabela 6). Tomando-se os 20 acessos como uma população, seis dos sete locos foram polimórficos (86%) sendo PGI-2 o único loco que não detectou variação nos 20 acessos. O número médio de alelos por loco (A) foi de 1,2, variando de 1,0 a 1,6. A heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_e) no conjunto dos 20 acessos foi de 0,136 e 0,268, respectivamente.

Tabela 6. Número médio de alelos por loco (A), proporção de locos polimórficos (P) e heterozigiosidade observada (Ho) de 20 acessos de alho, a partir de 7 locos alozímicos (Florianópolis-SC, CCA/UFSC, 2003).

Acessos	A	P (%) ¹	Ho
CD82- Jonas	1,1 (0,1)	14,3	0,143 (0,143)
CD83-R. Caxiense	1,1 (0,1)	14,3	0,143 (0,143)
CD93-Mexicano	1,1 (0,1)	14,3	0,143 (0,143)
CD85-Hard Steim	1,0 (0,0)	0,0	0,000 (0,000)
CD86-Soft Steim	1,0 (0,0)	0,0	0,000 (0,000)
CD87-Chinês/Arg	1,4 (0,2)	42,9	0,429 (0,202)
CD88-Chinês/Chi	1,0 (0,0)	0,0	0,000 (0,000)
CD00-Gigante	1,3 (0,2)	28,6	0,286 (0,184)
CD90-Chonan	1,1 (0,1)	14,3	0,143 (0,143)
CD91-Caçador-30	1,0 (0,0)	0,0	0,000 (0,000)
CD92-Caçador-40	1,0 (0,0)	0,0	0,000 (0,000)
CD84-Contestado	1,1 (0,1)	14,3	0,143 (0,143)
CD94-Colorado	1,3 (0,2)	28,6	0,286 (0,184)
CD95-Cará	1,0 (0,0)	0,0	0,000 (0,000)
CD96-Russo	1,1 (0,1)	14,3	0,143 (0,143)
CD97-Fuego/INTA	1,0 (0,0)	0,0	0,000 (0,000)
CD98- Chinesão	1,0 (0,0)	0,0	0,000 (0,000)
CD99-Quitéria	1,1 (0,1)	14,3	0,143 (0,143)
CD89-Blanco	1,1 (0,1)	14,3	0,143 (0,143)
CD01-Alho Rei	1,6 (0,2)	57,1	0,571 (0,202)
Média (%)	1,2	13,6	0,136

^{1/} Critério de 95%

A estimativa dos valores de similaridade e distância genética foi feita com uso de marcadores alozimicos, empregando-se as medidas não viesadas propostas por NEI (1978). O grau de similaridade genética entre os 20 acessos variou de 0,334 entre os acessos CD82 e CD01 a 1,0, quando comparados os acessos CD91 com CD92, (Tabela 7).

Tabela 7. Similaridade (diagonal superior) e distância genética (diagonal inferior) não viesadas de NEI (1978), para os 20 acessos de alho (Florianópolis-SC, CCA/UFSC 2003).

Acessos	Acessos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1 CD82	*****	0,906	0,742	0,707	0,825	0,334	0,750	0,813
2 CD83	0,098	*****	0,710	0,707	0,825	0,735	0,750	0,656
3 CD84	0,298	0,342	*****	0,669	0,791	0,759	0,710	0,871
4 CD85	0,347	0,347	0,401	*****	1,000	0,756	0,825	0,707
5 CD86	0,192	0,192	0,234	0,000	*****	0,882	0,943	0,825
6 CD87	0,403	0,308	0,276	0,280	0,576	*****	0,935	0,735
7 CD88	0,288	0,288	0,342	0,192	0,059	0,067	*****	0,813
8 CD89	0,208	0,421	0,138	0,347	0,192	0,308	0,208	*****
9 CD90	0,247	0,134	0,750	0,192	0,059	0,141	0,134	0,247
10 CD91	0,288	0,288	0,342	0,192	0,059	0,067	0,000	0,208
11 CD92	0,288	0,288	0,543	0,059	0,192	0,403	0,288	0,470
12 CD93	0,288	0,288	0,543	0,059	0,192	0,403	0,288	0,470
13 CD94	0,208	0,288	0,175	0,192	0,059	0,141	0,065	0,065
14 CD95	0,175	0,215	0,105	0,234	0,091	0,189	0,175	0,101
15 CD96	0,238	0,238	0,286	0,154	0,029	0,171	0,095	0,238
16 CD97	0,200	0,164	0,573	0,154	0,297	0,539	0,405	0,552
17 CD98	0,192	0,267	0,720	0,251	0,405	0,685	0,529	0,529
18 CD99	0,192	0,192	0,234	0,118	0,000	0,126	0,059	0,192
19 CD00	0,164	0,200	0,245	0,154	0,029	0,171	0,095	0,164
20 CD01	0,472	0,417	0,765	0,425	0,425	0,523	0,472	0,723

Tabela 7. Continuação

Acessos	Acessos							
	9	10	11	12	13	14	15	16
1 CD82	0,780	0,750	0,750	0,750	0,813	0,839	0,788	0,819
2 CD83	0,875	0,750	0,750	0,750	0,750	0,807	0,788	0,849
3 CD84	0,839	0,710	0,581	0,581	0,839	0,900	0,751	0,564
4 CD85	0,825	0,825	0,943	0,943	0,825	0,791	0,857	0,857
5 CD86	0,943	0,943	0,825	0,825	0,943	0,913	0,972	0,743
6 CD87	0,869	0,935	0,668	0,668	0,869	0,828	0,843	0,583
7 CD88	0,875	1,000	0,750	0,750	0,938	0,839	0,910	0,667
8 CD89	0,781	0,813	0,625	0,625	0,938	0,904	0,788	0,576
9 CD90	*****	0,875	0,750	0,750	0,875	0,936	0,910	0,728
10 CD91	0,134	*****	1,000	0,750	0,938	0,839	0,910	0,667
11 CD92	0,288	0,000	*****	1,000	0,750	0,710	0,849	0,910
12 CD93	0,288	0,288	0,000	*****	0,750	0,710	0,849	0,910
13 CD94	0,134	0,065	0,288	0,288	*****	0,904	0,910	0,667
14 CD95	0,066	0,175	0,342	0,342	0,101	*****	0,877	0,658
15 CD96	0,095	0,095	0,164	0,164	0,095	0,132	*****	0,706
16 CD97	0,318	0,405	0,095	0,095	0,405	0,419	0,348	*****
17 CD98	0,434	0,529	0,192	0,192	0,529	0,401	0,464	0,089
18 CD99	0,059	0,059	0,192	0,192	0,059	0,091	0,029	0,297
19 CD00	0,062	0,095	0,238	0,238	0,095	0,063	0,061	0,307
20 CD01	0,417	0,472	0,317	0,317	0,589	0,439	0,348	0,448

Tabela 7. Continuação

Acessos	Acessos			
	17	18	19	20
1 CD82	0,825	0,825	0,849	0,624
2 CD83	0,766	0,825	0,819	0,659
3 CD84	0,487	0,791	0,783	0,465
4 CD85	0,778	0,889	0,857	0,654
5 CD86	0,667	1,000	0,972	0,654
6 CD87	0,504	0,882	0,843	0,593
7 CD88	0,589	0,943	0,910	0,624
8 CD89	0,589	0,825	0,849	0,485
9 CD90	0,648	0,943	0,940	0,659
10 CD91	0,589	0,943	0,910	0,624
11 CD92	0,825	0,825	0,788	0,728
12 CD93	0,825	0,825	0,788	0,728
13 CD94	0,589	0,943	0,910	0,555
14 CD95	0,669	0,913	0,939	0,645
15 CD96	0,629	0,972	0,941	0,706
16 CD97	0,915	0,743	0,735	0,639
17 CD98	****	0,667	0,743	0,654
18 CD99	0,405	*****	0,972	0,654
19 CD00	0,297	0,029	*****	0,673
20 CD01	0,425	0,425	0,396	*****

O dendograma formado a partir de sete locos alozimicos, Figura 6, revelou a formação de três grupos; o primeiro formado por duas variedades chinesas, o segundo pelo alho Rei e o terceiro pelas demais 17 cultivares. Dentro deste último, e considerando um nível de similaridade de 93%, observou-se a formação de sete sub-grupos. Com isto ficaram destacadas de forma isolada as cultivares Blanco (Argentina), Cará (Brasil) e Chinesão (China), todas facilmente reconhecíveis morfológicamente. Num destes sete subgrupos, há um conjunto de sete cultivares brasileiras, sendo quatro delas com similaridade genética entre si de 100%. Similaridade de 100% também foi demonstrada pelas cultivares Hard Steim e Soft steim, ambas de origem chinesa.

Associando os padrões isoenzimáticos e as características morfológicas de maior importância na análise multivariada, foi possível obter um novo agrupamento, que está explicitado na Tabela 8. Nas figuras 7 e 8 são apresentadas as características das folhas e dos bulbos e bulbilhos, respectivamente, das cultivares de alho nacionais e introduzidas.

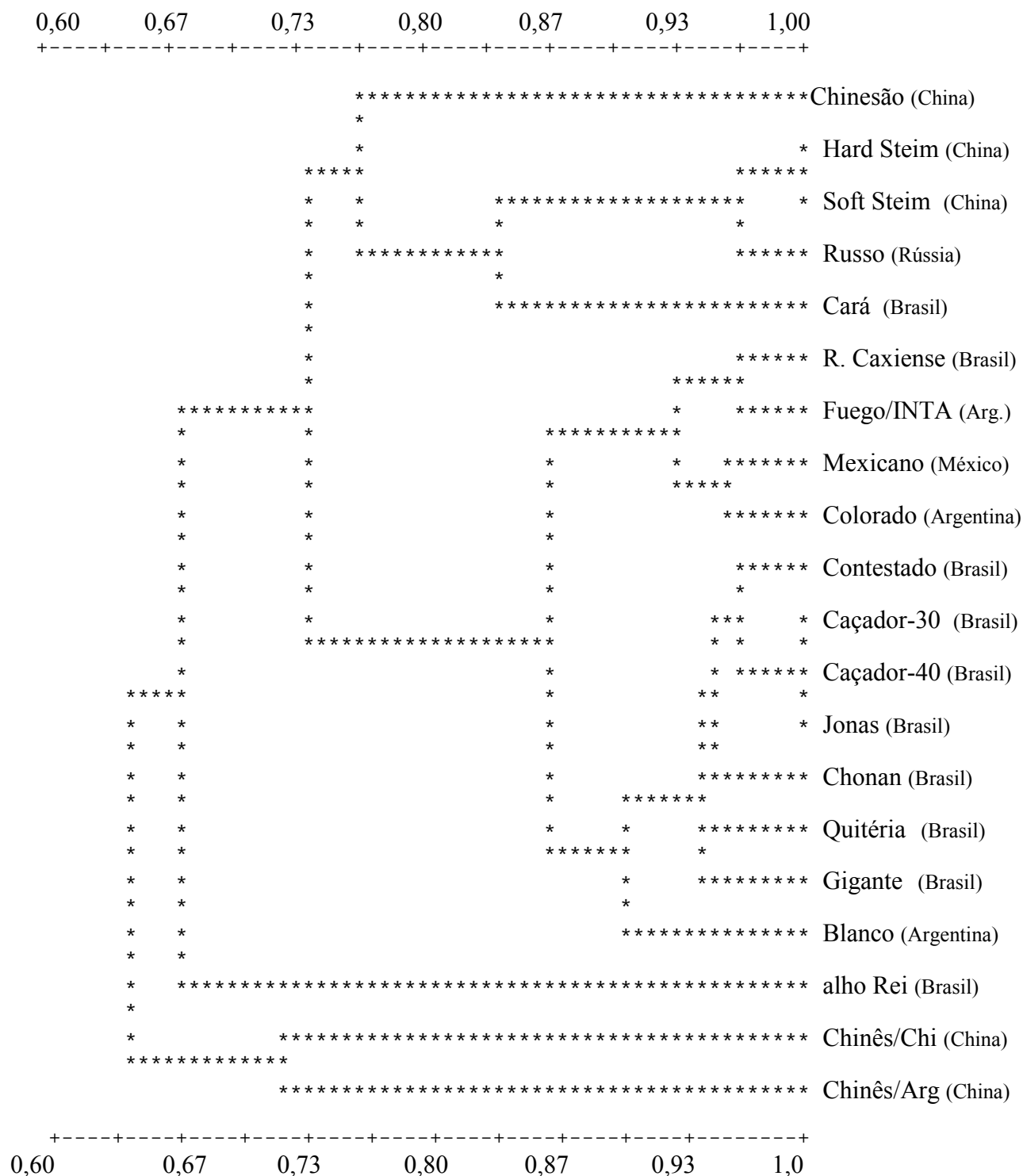


Figura 6. Dendrograma de Similaridade genética não viesada de NEI (1978), obtido através da técnica UPGMA, para 20 acessos de alho, empregando-se 7 locos alozímicos ($r=0,83$) (Florianópolis-SC, CCA/UFSC, 2003).

Tabela 8 . Padrões isoenzimáticos e características morfológicas utilizadas para agrupamento dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de alho de Santa Catarina (Florianópolis-SC, CCA/UFSC, 2003).

Grupo	subgrup o	Identificação	Padrão de isoenzima							Características morfológicas
			ACP	ADH	G2DH	G6MDH	MDH	PGI-1	PGI-2	
I	a	Chinesão	A	A	A	A	A	A	A	Bulbo codiforme, túnica branca, bulbilhos brancos, folhas largas e decumbentes
II	a	Hard Steim Soft Steim	C C	A A	A A	A A	A A	C C	A A	Bulbos chato, túnica branca, bulbilhos arroxeados, folhas com largura intermediária e porte semi-ereto dobrando-se ao meio
	b	Russo	C	B	A	A	A	C	A	Idem ao anterior mas com bulbilhos brancos
	c	Cará	C	A	A	A	C	C	A	Bulbo chato, túnica branca, bulbilhos brancos, folha estreita e ereta
III	a	Roxo Caxiense	A	A	C	A	A	D	A	Bulbo codiforme, túnicas pérola, bulbilhos roxos, exceto Mexicano (rosado), folhas de largura intermediária com porte semi-ereto dobrando-se apenas nas extremidades, exceto a CV. Colorado.
		Fuego/INTA	A	A	A	A	A	C	A	
		Mexicano	C	A	C	A	A	A	A	
		Colorado	B	A	C	A	A	B	A	
	b	Contestado	B	A	C	A	A	C	A	Bulbos codiforme, com túnica pérola, bulbilho roxo com variações na intensidade da cor, folhas inermidiárias com porte semi-ereto, exceto para cultivar Contestado (folhas mais largas dobrando-se bruscamente ao meio)
Caçador-30		C	A	C	A	A	C	A		
Caçador-40		C	A	C	A	A	C	A		
Jonas		C	A	C	A	A	C	A		
Chonan		C	A	C	A	A	B	C	A	
Quitéria	A	B	C	A	A	B	B	A		
c	Gigante	C	A	C	B	A	A	A	Bulbo circular, túnica pérola com estrias arroxeadas, bulbilhos arroxeados, folhas intermediárias com porte semi-ereto	
d	Blanco	C	A	C	A	A	B	A	Bulbo codiforme, túnica branca, bulbilhos brancos, folhas intermediária e decumbentes	
IV	a	alho-Rei	C	A	E	A	D	D	A	Bulbo circular, túnica branca, bulbilhos grandes e brancos, folhas muito largas e decumbentes com estrias arroxeadas na superfície
V	a	Chinês/Arg	C	C	C	B	B	C	A	Bulbo codiforme com túnicas arroxeadas, bulbilhos rosados, folha estreita e porte ereto
VI	b	Chinês/Chi	C	C	C	A	A	A	A	Idem ao anterior mas com variações na coloração dos bulbilhos



Figura 7. Aspecto geral das folhas de plantas de allho, A: folhagem representativa do grupo I-a, clone tipo Chinesão; B: folhagem representativa do grupo II-c, clone tipo Cará; C: folhagem representativa do grupo III-b, clone tipo Contestado; D: folhagem representativa do grupo IV-a, clone tipo Rei.

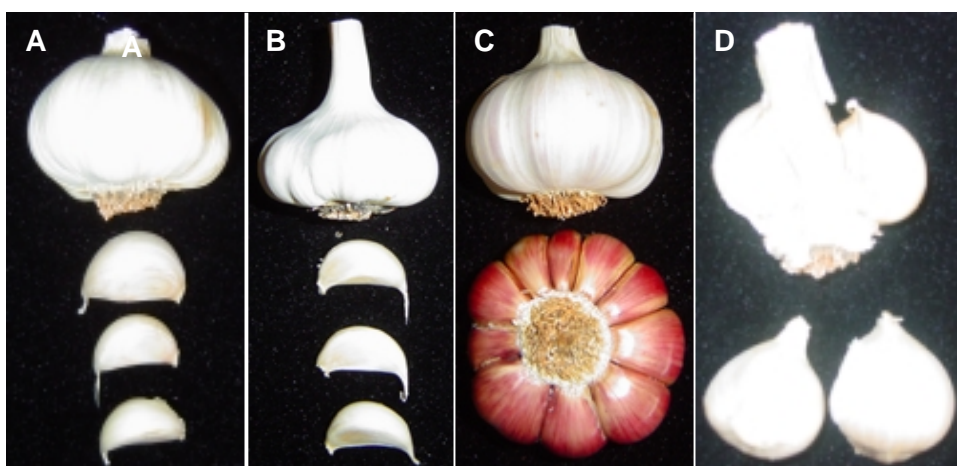


Figura 8. Características de bulbos e bulbilhos de allho, A: bulbo e bulbilhos representativo do grupo I-a, clone tipo Chinesão; B: bulbo e bulbilhos representativo do grupo II-c, clone tipo Cará; C: bulbo e bulbilhos representativa do grupo III-b, clone tipo Contestado e D) bulbo e bulbilhos representativo do grupo IV-a, clone tipo Rei.

4.3.1 Otimização do protocolo Para Marcadores RAPD

A reação de amplificação, a partir do qual se procedeu a otimização das reações de RAPD, foi o descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998), que consta de tampão PCR 1X, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,8 mg/μL de BSA, 0,4 μM de iniciadores, 1 U de Taq DNA-polimerase e 13 μL de volume total de reação.

O aumento gradativo na concentração de magnésio proporcionou aumento no número de bandas amplificadas. A concentração de 2,0 mM gerou padrões de bandas com pouca intensidade, enquanto uma concentração de 2,5 mM gerou igual número de bandas, porém com maior intensidade comparada a concentração de 2,0 mM. A concentração de 3,0 mM possibilitou a amplificação de maior número de bandas com ótima intensidade, gerando padrões de fácil interpretação.

A utilização de 0,3 ou 0,4 μM de iniciadores não proporcionou diferenças nos produtos amplificados, gerando igual padrão de bandas para ambas as concentrações. O mesmo ocorreu em relação as diferentes concentrações de dNTPs testadas, 0,2 e 0,4 mM, não havendo diferenças no padrão de bandas amplificadas para ambas as concentrações. A utilização de 5 e 8 ng/μL de DNA amplificaram poucas bandas, com baixa intensidade gerando padrões de difícil interpretação. Já as concentrações de 12 e 15 ng/μL não apresentaram nenhuma diferença entre si em relação a resolução e padrões obtidos, mas quantitativamente superior ao obtido com as concentrações de 5 e 8 ng/μL de DNA.

A utilização de BSA na concentração de 0,8 μg/μL, revelou-se necessária, uma vez que as reações realizadas com a presença desse reagente resultaram em produtos amplificados, gerando bandas de igual intensidade para todos os iniciadores testados.

Foi adotado para este estudo o volume de 20 μL para reação, sendo desnecessário o uso de 25 μL, já que não foram observadas diferenças quanto a resolução e padrões obtidos entre os dois volumes. O volume de 13 μL mostrou-se ineficaz, pois gerou um menor número de bandas amplificadas, comparativamente aos outros volumes.

Com base nos testes realizados, o coquetel que proporcionou melhor amplificação foi composto por tampão de PCR 1X, 3,0 mM de cloreto de magnésio, 0,2 mM de dNTPs, 0,8 mg/μL de BSA, 0,3 μM de iniciadores, 1U de *Taq* DNA-polimerase e 12 ng/μL de DNA genômico em um volume de 20 μL.

4.3.2 Nível de Polimorfismo

Dentre os sessenta iniciadores utilizados, 49 (82%) amplificaram produtos visíveis, revelando um total de 158 bandas (3,2 bandas por iniciador) sendo que 19 destes 49 (39%) apresentaram polimorfismo entre as oito amostras de DNA utilizadas nesta fase piloto.

Para a caracterização dos 96 acessos foram selecionados os dez iniciadores com melhor nitidez e maior número de bandas, dos 19 polimórficos, os quais amplificaram 47 bandas sendo que, 25 (53,2%) foram polimórficas (Figura 9). Destes iniciadores, 3 foram escolhidos do grupo de 15 iniciadores previamente utilizados por Maass e Klaas (1995) e outros três foram também utilizados por Al-Zahim *et al.* (1997). O tamanho dos fragmentos amplificados variou entre 300 a 1300 pares de bases (Figura 10).

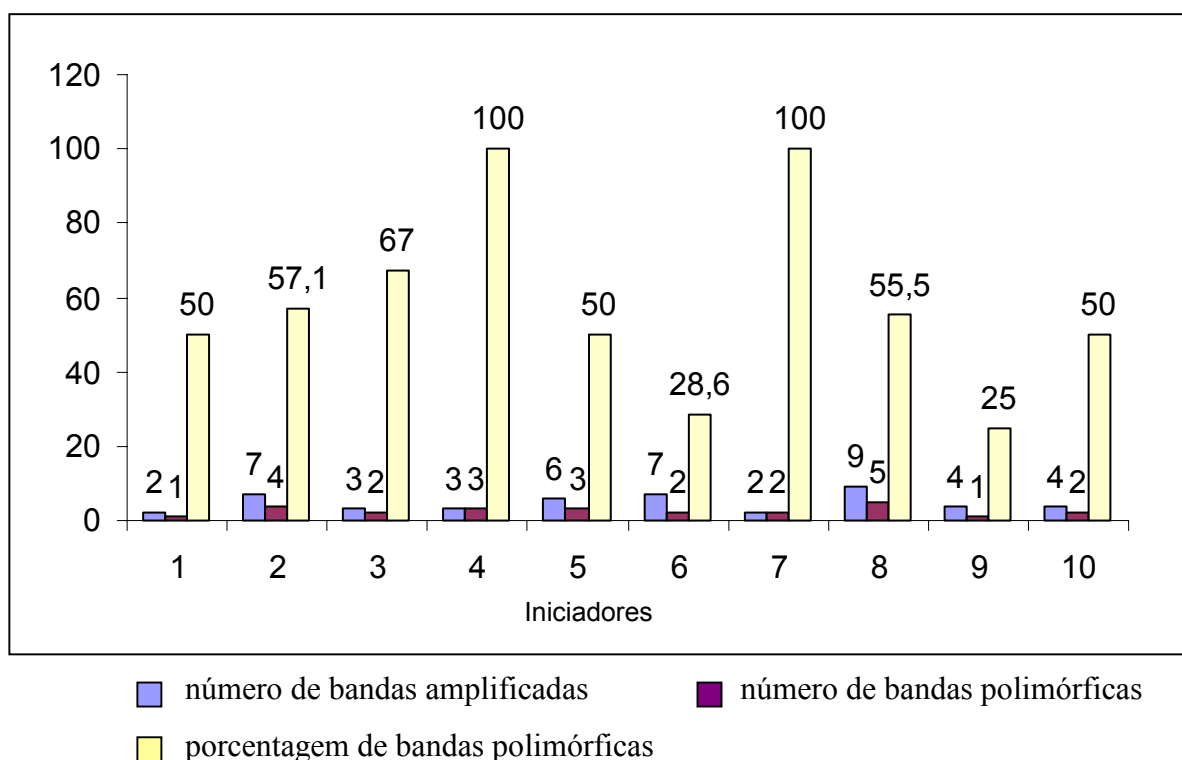


Figura 9. Número total de bandas, número de bandas polimórficas e porcentagem de bandas polimórficas para iniciadores RAPD utilizados para análise da diversidade genética do BAG de alho, 1: OPA03; 2: OPAN05; 3: OPB17; 4: OPB18; 5: OPC07; 6: OPC09; 7: OPD10; 8: OPE06; 9: OPE11; 10: OPE17 (Florianópolis-SC, CCA/UFSC, 2003).

4.3.3 Análise da Diversidade Genética a Partir de Marcadores RAPD

O padrão obtido com a amplificação das 47 bandas foi utilizado para estimar os valores de similaridade genética entre os acessos através do coeficiente de Jaccard. Posteriormente, usando estes coeficientes foi construído um dendograma de similaridade genética entre os acessos (Figura 11). A exemplo das análises morfológica e isoenzimática o alho Rei formou um grupo em separado.

Usando o mesmo critério de 93% de similaridade, já adotado para as isoenzimas, observou-se a formação de sete grupos, com características peculiares. O maior deles incluiu a maioria dos acessos crioulos além de três cultivares comerciais (Blanco, Chinesão e Cará). O segundo maior grupo incluiu apenas uma cultivar comercial (Gigante) além de 26 acessos crioulos. Cabe destacar que a cultivar Gigante e o acesso 767 apresentaram similaridade de 100%. Os outros grupos foram formados exclusivamente por cultivares comerciais.

Com base nos marcadores RAPD, ocorreu 100% de similaridade entre vários acessos nos grupos I, II, III, IV e VI. O ponto de união de todos os grupos foi de 63% de similaridade, sendo este também, o ponto de união do grupo VII com os demais grupos. O genótipo da espécie *ampelopras* (alho Rei) apresentou o menor índice de similaridade genética em relação aos outros acessos (63%). O coeficiente de correlação cofenética foi de 0,92 e o teste de Mantel foi igual a 12,4, para $p=1.000$ (probabilidade de $Z < \text{obs.}$).



400

pb

Figura 10. Padrões de fragmentos de DNA amplificados em gel de agarose 1,5% dos acessos de alho: OPB18: acessos 1 a 22; OPC09: acessos 23 a 44; OPC07: acessos 45 a 73 ; **M**) Ladder 1Kb (Florianópolis-SC, CCA/UFSC, 2003).

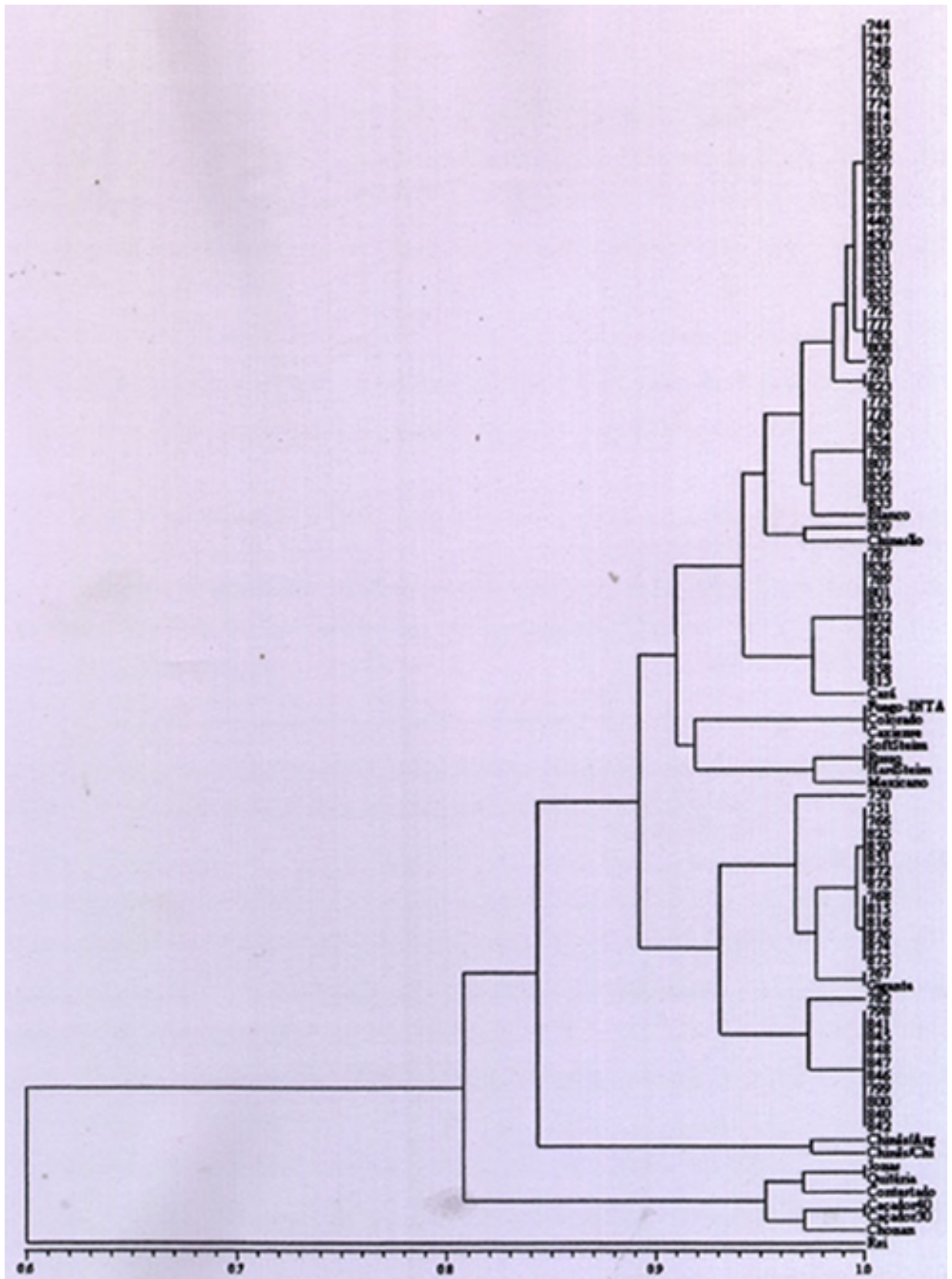


Figura 11. Dendrograma de similaridade genética obtida através do índice de Jaccard, de 96 acessos de alho, estimado a partir de 47 marcadores RAPD ($r= 0,92$) (Florianópolis-SC, CCA/UFSC, 2003).

4.4 MARCADORES AFLP

4.4.1 Padronização do Protocolo Para Marcadores AFLP

A concentração de iniciadores *EcoRI* que apresentou melhor nitidez das bandas foi a concentração de 0,35 μL do iniciador não diluído, sendo o volume de reação do iniciador da *MseI* mantido em 2,25 μL . O uso do iniciador *EcoRI* diluído nos volumes de 0,25 μL e 0,50 μL resultou em bandas fracas de difícil interpretação, apresentando ambos uma qualidade similar. O mesmo iniciador usado sem a diluição recomendada pelo fabricante nos volumes de 0,25 μL e 0,35 μL amplificou um grande número de bandas. No entanto, o volume de 0,35 μL gerou padrões de bandas com melhor intensidade porém, com certo grau de ambigüidade. Contudo, só foram consideradas as bandas identificáveis de forma não ambígua.

4.4.2 Análise da Diversidade Genética a Partir de Marcadores AFLP

Após o *screening* que envolveu 18 combinações de iniciadores *EcoRI* + *MseI*, (Tabela 9), foram selecionados para este estudo três combinações: E-ACG + M-CAG, E-ACT + M-CTA e E-ACG + M-CAT.

As combinações E-AAG + M-CTG, E-AAG + M-CAT e E-AAG + M-CTC geraram padrões com poucas bandas, sendo todas monomórficas. As combinações E-ACT + M-CAC, E-ACT + M-CTT, E-ACC + M-CAC, E-AAG + M-CAG, E-ACC + M-CTG e E-ACT + M-CAA geraram padrões com considerável porcentagem de bandas polimórficas, porém, apresentando fraca resolução das mesmas. As combinações E-ACG + M-CAA, E-ACG + M-CAC, E-AGC + M-CTG, E-ACA + M-CAG, E-AGC + M-CTC e E-ACA + M-CAC geraram padrões de bandas com polimorfismo e com boa resolução, porém com certa ambigüidade, dificultando a interpretação.

As combinações E-ACT + M-CTA, E-ACG + M-CAG e E-ACC + M-CAT, selecionadas para o presente estudo, geraram padrões de banda com boa resolução e porcentagem de bandas polimórficas, variando de 11,7 a 19,0%. Devido ao grande número de bandas reveladas, selecionou-se para proceder a análise aquelas que não deixaram nenhuma dúvida de interpretação.

Tabela 9. Combinações de iniciadores testados no protocolo de marcadores AFLP, número total de bandas, número total de bandas polimórficas e porcentagem de bandas polimórficas geradas (Florianópolis-SC, CCA/UFSC, 2003).

Combinação de iniciadores AFLP	Número total de bandas	Número total de bandas polimórficas	Porcentagem de bandas polimórficas
E-ACT + M-CAC	68	13	19,0
E-ACT + M-CTT	78	5	6,4
E-ACT + M-CTA¹	75	13	17,3
E-AAG + M-CTG	45	0	0,0
E-AAG + M-CAT	28	0	0,0
E-AAG + M-CTC	40	0	0,0
E-ACG + M-CAG¹	105	20	19,0
E-ACG + M-CAA	58	6	10,3
E-ACG + M-CAC	40	4	10,0
E-AGC + M-CTG	46	5	10,7
E-ACA + M-CAG	72	4	5,5
E-ACC + M-CAC	60	8	13,3
E-ACC + M-CAT¹	128	15	11,7
E-AGC + M-CTC	40	5	12,5
E-AAG + M-CAG	48	5	10,4
E-ACA + M-CAC	66	0	0,0
E-ACC + M-CTG	50	4	8,0
E-ACT + M-CAA	93	13	13,9

¹⁾ Combinações de iniciadores utilizados na análise

Das três combinações de iniciadores AFLP utilizadas na análise, gerou-se um número total de 308 bandas, média de 102,7 bandas por combinação. Das 308 bandas consideradas, 48 (15,6%) revelaram polimorfismo e foram utilizadas como marcadores para análise da diversidade genética do BAG de alho. O tamanho dos fragmentos amplificados variou de 40 a 330 pares de bases (Figura 12).

Estabelecendo-se um limite máximo de 93% para similaridade entre os acessos, verificou-se a formação de 13 grupos de acessos, no dendograma, com base em 48 marcadores

AFLP polimórficos utilizados (Figura 13). O ponto de união de todos os grupos foi de 43% de similaridade, sendo este também, o ponto de união do grupo 9 com os demais grupos. O alho-rei da espécie *ampelopram* apresentou, a exemplo da análise com RAPD, o menor índice de similaridade em relação aos outros acessos (43%), sendo este índice também o ponto de união com os outros grupos. O coeficiente de correlação cofenética foi de 0,94 e o teste de Mantel foi igual a 11,5 para $p= 1.000$ (probabilidade de $Z < \text{obs.}$).

De maneira geral as 48 bandas AFLPs não foram capazes de diferenciar vários grupos de acessos crioulos entre si ou até mesmo cultivares entre si como é o caso de Soft Steim e Hard Steim, ou Blanco e Colorado.

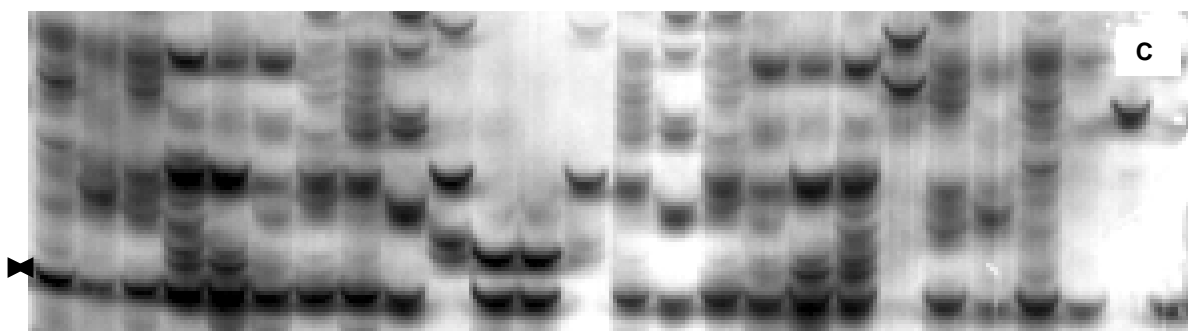
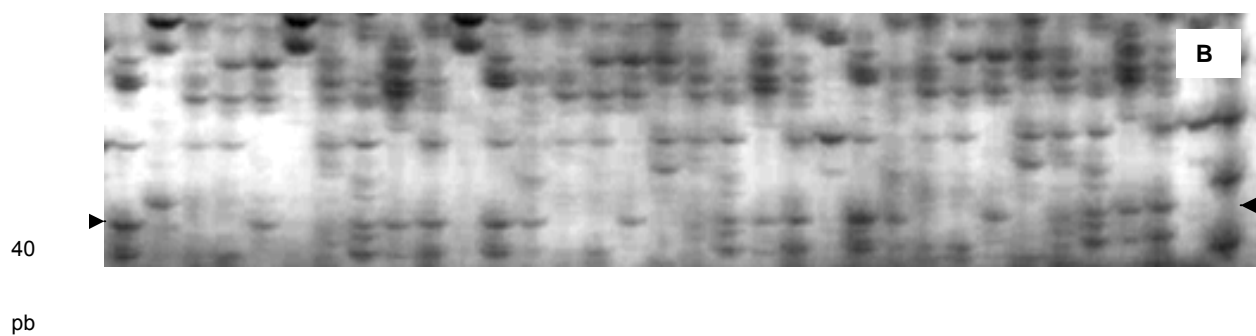
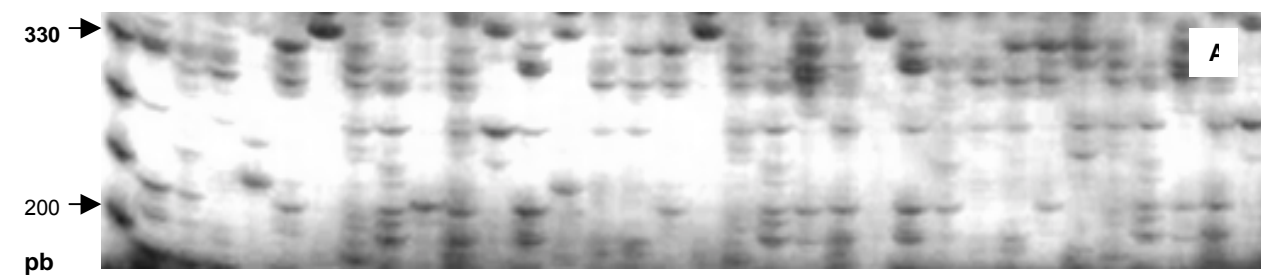


Figura 12. Amplificação de marcadores AFLP em genótipos do BAG de alho de Santa Catarina, A) E-ACG + M-CAG, B) E-ACT + M-CTA e C) E-ACC + M-CAT (Florianópolis-SC, CCA/UFSC, 2003).

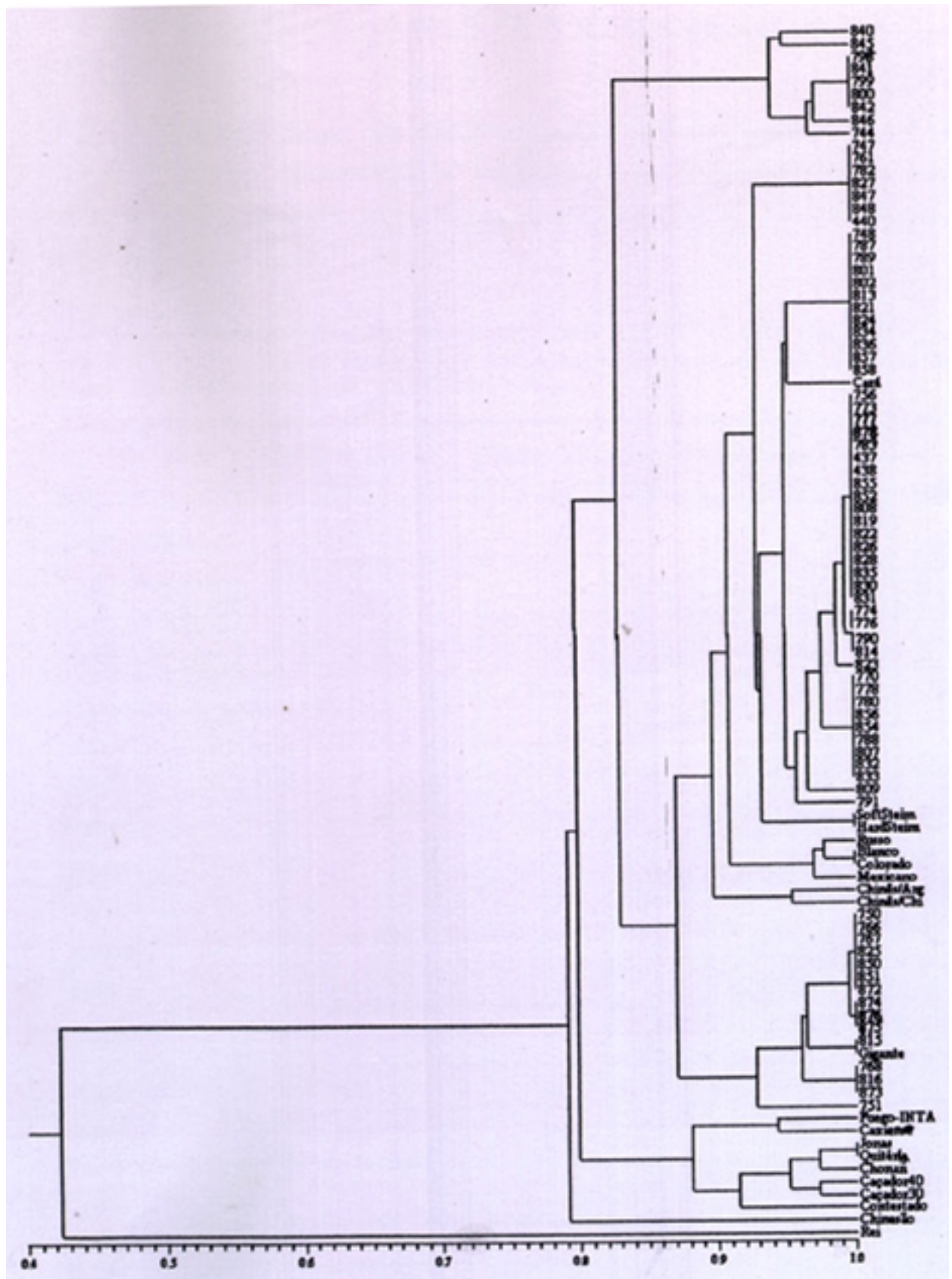


Figura 13. Dendrograma de similaridade genética obtida através do índice de Jaccard, de 96 acessos de alho, estimado a partir de 48 marcadores AFLP ($r= 0,94$) (Florianópolis-SC, CCA/UFSC, 2003).

4.5 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA CONJUNTA COM MARCADORES RAPD E AFLP

Para a análise conjunta da diversidade genética envolvendo marcadores RAPD e AFLP, 95 marcadores foram utilizados (47 marcadores RAPD e 48 marcadores AFLP), sendo estes os mesmos utilizados para a análise da diversidade genética dos mesmos acessos de forma separada (Tabela 10).

Tabela 10. Iniciadores utilizados nas reações RAPD e AFLP e respectivos índices de diversidade genética para os 96 acessos do Banco Atividade Germoplasma (BAG) de alho de Santa Catarina (Florianópolis-SC, CCA/UFSC, 2003).

Iniciadores	Número total de bandas	Número total de bandas polimórficas	Porcentagem de bandas polimórficas
ACG + CAG	105	20	19,0
ACT + CTA	75	13	17,3
ACG + CAT	128	15	11,7
OPA03	2	1	50,0
OPAN05	7	4	57,1
OPB17	3	2	67,0
OPB18	3	3	100
OPC07	6	3	50,0
OPC09	7	2	28,6
OPD10	2	2	100
OPE06	9	5	55,5
OPE11	4	1	25,0
OPE17	4	2	50,0
Totais	355	73	--
Média	27,3	5,6	48,5

A análise de agrupamento, utilizando-se um total de 95 marcadores dominantes (RAPD e AFLP) revelou a existência de 10 grupos quando estabelecido o critério de 93% de similaridade genética entre os acessos (Figura 14). O coeficiente de correlação cofenética foi de 0,95 e o teste de Mantel foi igual a 11,9 para $p= 1.000$ (probabilidade de $Z < \text{obs.}$).

As cultivares comerciais, a exceção de Cará e Gigante, formaram sete grupos distintos. Os demais três grupos incluíram todos os 76 acessos crioulos além das cultivares Cará e Gigante. Esta cultivar Gigante apresentou similaridade genética de mais de 98% com o acesso 815. Similaridade genética de 100% foi detectada entre vários acessos crioulos, em distintos subgrupos, bem como para as cultivares Soft Steim e Hard Steim.

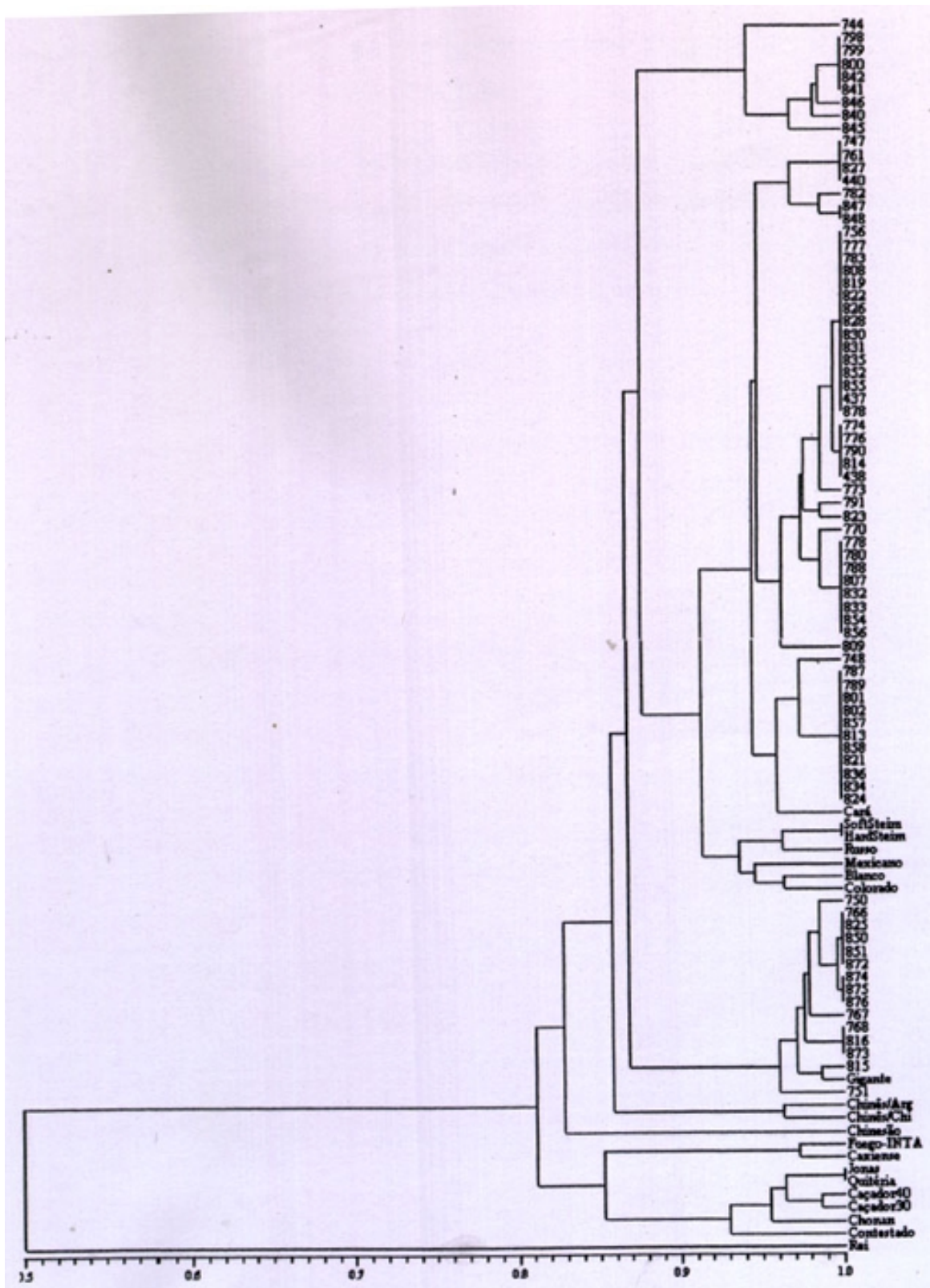


Figura14. Dendrograma de similaridade genética obtida através do índice de Jaccard, de 96 acessos de alho, estimado com 47 marcadores RAPD e 48 marcadores AFLP agrupados ($r= 0,95$) (Florianópolis-SC, CCA/UFSC, 2003).

4.6 ANÁLISE COMPARATIVA DA SIMILARIDADE GENÉTICA DETECTADA PELOS MARCADORES MORFOLÓGICOS, ISOENZIMÁTICOS, RAPD E AFLP

Nesta análise comparativa dos resultados proporcionados pelo emprego de diferentes marcadores, foram incluídas apenas as 20 cultivares comerciais de alho, para as quais também há resultados com isoenzimas. Assim, foram gerados três novos dendogramas com base em 16 marcadores morfológicos, 47 RAPD e 48 AFLP (Figuras 15, 16 e 17).

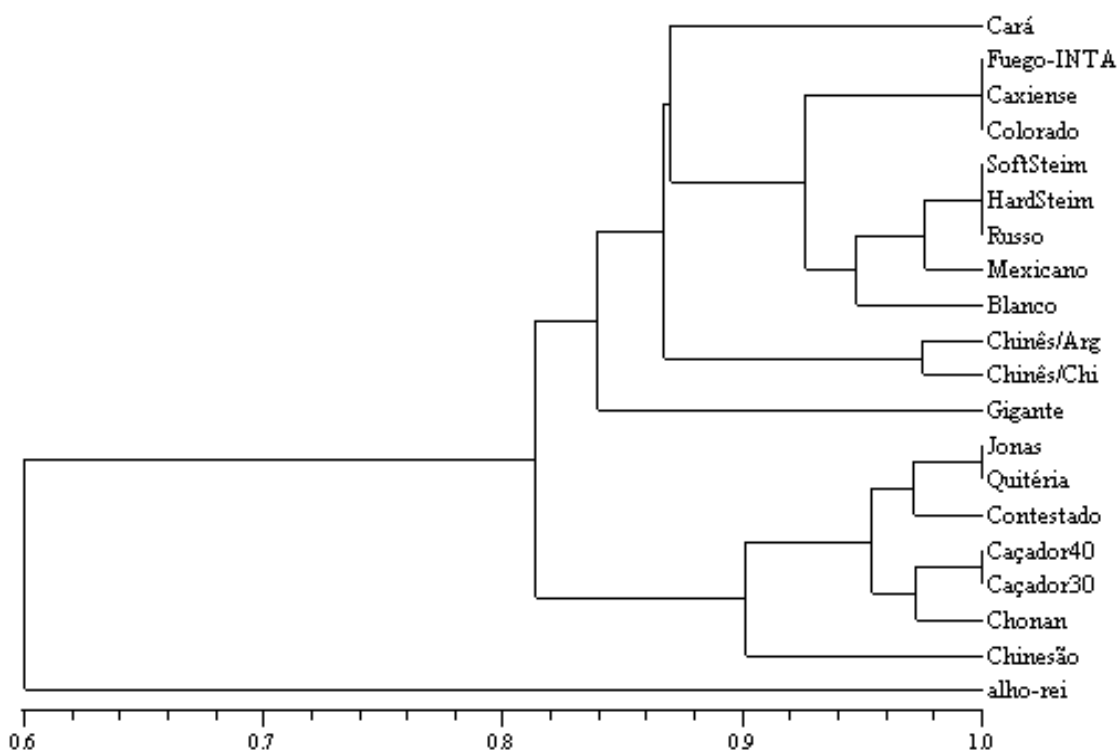


Figura 15 . Dendrograma de similaridade genética obtida através do índice de Jaccard, de 20 cultivares de alho, estimado a partir de 47 marcadores RAPD ($r= 0,95$) (Florianópolis-SC, CCA/UFSC, 2003).

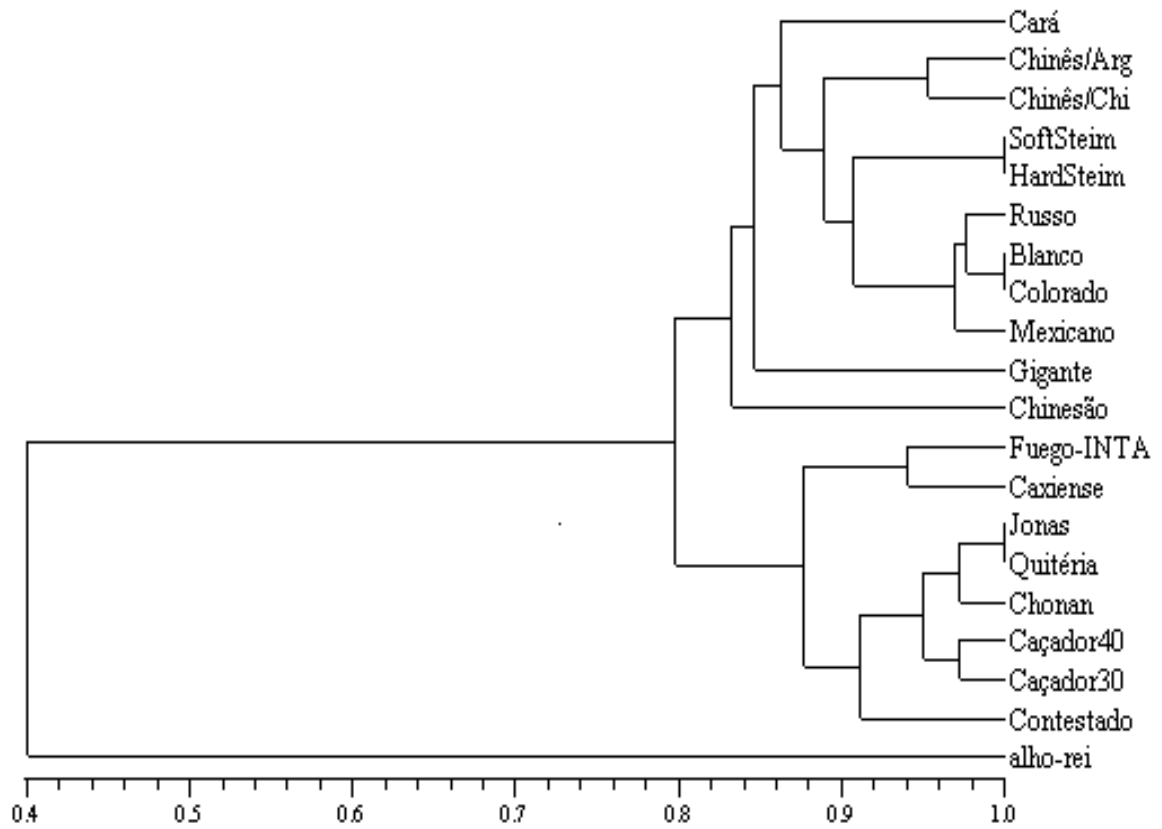


Figura 16. Dendrograma de similaridade genética obtida através do índice de Jaccard, de 20 cultivares de alho, estimado a partir de 48 marcadores AFLP ($r= 0,97$) (Florianópolis-SC, CCA/UFSC, 2003).

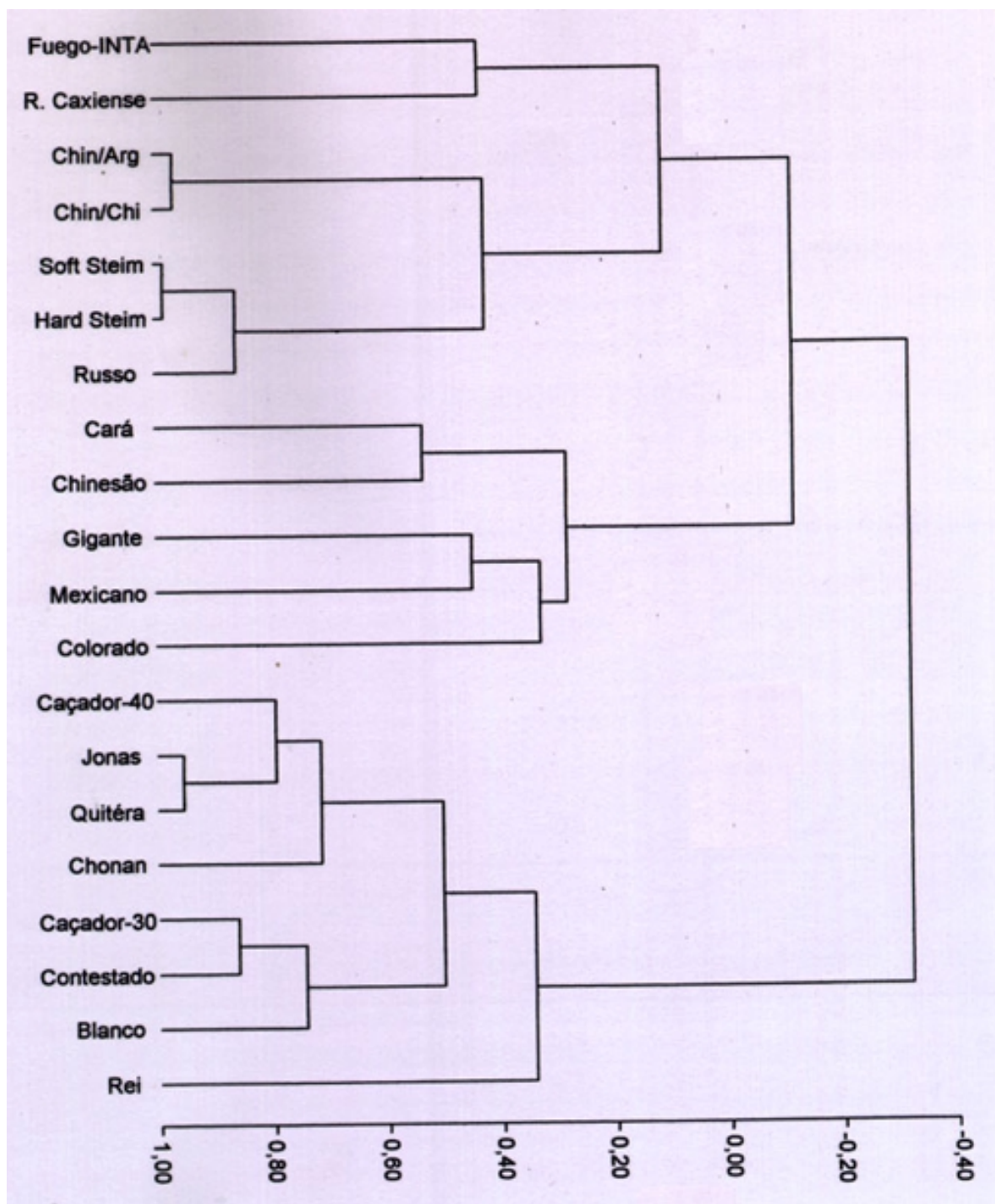


Figura 17. Dendrograma de similaridade genética de 20 cultivares de alho, estimado com 16 marcadores morfológicos (Florianópolis-SC, CCA/UFSC, 2003).

De posse dos quatro dendogramas, pode-se observar a formação de dois grandes grupos de similaridade nas quatro análises, com exceção da cultivar Rei que isolou-se, em relação aos outros grupos de acessos, nos dendogramas das isoenzimas, RAPD e AFLP com índices de similaridade genética de 68, 60 e 40%, respectivamente. Por outro lado, no dendograma gerado pela análise multivariada, pode-se observar uma forte relação desta mesma cultivar com o grupo II, porém, separada por um baixo índice de similaridade (35%) das demais cultivares desse mesmo grupo. A cultivar Chinesão compartilha o grupo I nas análises multivariada, isoenzima e AFLP. A cultivar Fuego/INTA situou-se no grupo I da análise multivariada e RAPD e no grupo II nas análises de isoenzimas e AFLP. As cultivares Mexicano, Colorado, Gigante, Chinês/Arg e Chinês/Chi, compartilham o grupo II na análise de isoenzimas e nas demais análises compartilham o grupo I.

As demais cultivares comerciais situaram nas mesmas relativas posições dos dendogramas, com a ressalva de que na análise isoenzimática as cultivares Chinês/Arg e Chinês/Chi agruparam-se separadamente dos dois grandes grupos, ligando-se a esses com 65% de similaridade (Figura 5).

Com exceção das cultivares Chinesão, situada nos grupos I e II nos dendogramas AFLP e RAPD, respectivamente, e compartilhando o grupo I nos dendogramas das isoenzimas e AFLP e Fuego/INTA, situada nos grupos I e II nos dendogramas RAPD e AFLP, respectivamente, e compartilhando o grupo II nos dendogramas das isoenzimas e AFLP, os demais acessos situaram nas mesmas relativas posições nos dendogramas, com algumas ressalvas para as isoenzimas. As cultivares Mexicano, Colorado, Gigante, Blanco, Chinês/Arg e Chinês/Chi. estão situadas no grupo II do dendograma isoenzimas, mas nas mesmas relativas posições (grupo I) dos dendogramas RAPD e AFLP. A cultivar rei, da espécie *ampeloprasum* isolou-se nos três dendograma, apresentando grau de similaridade de 40%, 60% e 68%, respectivamente para os dendogramas AFLP, RAPD e isoenzimas.

DISCUSSÃO

Até o momento, nenhum estudo de caracterização genética foi realizado com as variedades crioulas de alho existentes na região Sul do Brasil. Portanto, esta é a primeira contribuição no sentido de caracterizar e estimar a diversidade genética existente entre esses acessos, bem como identificar o grau de similaridade existente entre eles e as cultivares comerciais, também incluídas neste estudo.

Os resultados obtidos podem ser associados a quatro tópicos: avanços metodológicos, a caracterização da diversidade genética pelos diferentes marcadores, análise de agrupamento e a análise comparativa e conjunta envolvendo diferentes marcadores para as cultivares comerciais de alho.

Dentre os descritores recomendados pelo IPGRI (*International Plant Genetic Resources Institute*), cinco tiveram aplicabilidade comprovada neste trabalho, a saber, formato transversal do bulbo (FTB), largura da folha (LFO), cor da túnica do bulbo (CTB), cor da túnica do dente (CTD) e porte da planta (ARQ). Tais descritores fazem parte do grupo de descritores de maior importância na caracterização dos acessos. Isto é relevante, considerando que tais informações poderão ser utilizadas para facilitar o intercâmbio de material genético e de informações entre diversos países, principalmente das cultivares nacionais e introduzidas, aqui avaliadas, que são hoje cultivadas em diversas regiões do mundo.

Dois fatores são considerados cruciais para obtenção de uma boa resolução e atividade enzimática a partir da extração de enzimas de tecidos vegetais.: 1) a conservação do material vegetal desde o momento da coleta até a extração, e 2) a eliminação de polifenóis (Alfenas *et al.*, 1991). Contudo, além desses, a condição de cultivo influencia drasticamente na atividade da enzima. No trabalho de Dantas (2000), bandas do sistema enzimático Fosfatase Ácida (ACP), reveladas a partir de tecidos de porta-enxertos de macieira cultivados *in vitro*, apresentaram menor nitidez e diferentes padrões comparado aos tecidos das plantas cultivadas *in vivo*. Alfenas *et al.*, (1991) relata que além da importância de se empregar um mesmo tipo de tecido para comparação de amostras, e da influência do estágio vegetativo da planta na atividade da enzima é de fundamental importância a padronização das condições de cultivo das plantas visando reduzir efeitos negativos das condições de cultivo sobre a expressão diferencial de enzimas indutivas e de genes, de acordo com a diferenciação de tecidos. É bem provável que as condições artificiais de cultivo, utilizadas neste estudo, foram responsáveis pela falta de atividade enzimática ocorrida nas amostras desses acessos, tornando com isso, praticamente impossível a análise dos mesmos.

Poucos trabalhos referentes a comparação de tecidos para extração de proteínas têm sido encontrados na literatura. No presente trabalho, não foi encontrado diferença significativa entre os dois tipos de tecido analisados quanto a resolução das bandas, exceto para a raiz no sistema SKDH que apresentou melhor resolução comparado ao tecido da folha. Nos trabalhos de Augustin e Garcia (1993), tecidos de folhas jovens e raízes de alho foram igualmente responsivos quanto a resolução e atividade enzimática nos sistemas EST, GOT, PRX, MDH e ACP, sendo os dois últimos, também utilizados neste estudo. Divergindo de tais resultados, Siqueira *et al.*, (1985) relatam uma resolução satisfatória de enzimas de tecidos da extremidade de raízes jovens de alho para as isoenzimas PGI, EST, ADH e PRX, enquanto que apenas a isoenzima PGI apresentou atividade em folha. Vale ressaltar que, em nosso estudo foram testadas folhas e raízes de plantas em estágio avançado de crescimento, e tal fato poderia justificar as divergências encontradas entre nossos resultados e o de Siqueira *et al.*, (1985).

Nenhuma variação alélica foi observada nas isoenzimas GTDH, MADH, LAP, GDH, ALPA, GOT e SOD. Apesar de ter havido variação aparente para PGM, PRX, SKDH, EST (alfa e beta), IDH e ME, esses dados não foram incorporados na análise devido a baixa nitidez das bandas ou atividade inconsistente da enzima. Ao contrário dos resultados aqui obtidos, variações eletroforéticas bem resolvidas foram obtidas em trabalhos anteriores de caracterização genética para alguns desses sistemas. Pooler e Simon (1993), utilizando oito sistemas isoenzimáticos polimórficos para caracterização genética de 110 clones de alho, detectaram dois padrões para PGM e quatro padrões para β -EST. Siqueira *et al.*, (1985) estudando a diversidade genética de 72 clones de *A. sativum* e um clone de alho-rei (*A. ampeloprasum*) obtiveram dois padrões para a isoenzima PRX, evidenciando nesta, boa individualização das bandas. Por outro lado, há também estudos evidenciando não haver polimorfismo nesse mesmo sistema isoenzimático (Mass e Klass, 1995). É razoável considerar que essas diferenças sejam estabelecidas em função da metodologia empregada em cada caso, considerando as diferentes rotinas empregadas em cada laboratório. Um aspecto importante deste trabalho foi a adaptação da isoenzima G2DH, nunca utilizada anteriormente, para caracterização genética de alho. Isto significa um avanço, já que existem poucos sistemas isoenzimáticos, identificados para estudo dessa espécie.

Para a caracterização genética dos acessos de alho, com o uso de marcadores moleculares, houve a necessidade de adaptar os protocolos pré-estabelecidos, visando sua otimização e obtenção de resultados inequívocos, uma vez que um mesmo protocolo não se adapta a um grande número de espécies.

A otimização de reagentes para reações de RAPD é fator essencial para otimização de número de bandas geradas, sua intensidade e reprodutibilidade (Welsh e McClelland, 1990). Essa necessidade de otimização deve-se, inclusive, às diferentes marcas de reagentes utilizadas, as quais possuem diferentes graus de pureza, pois, as reações RAPD parecem ser extremamente sensíveis à qualidade dos reagentes para a produção de padrões de bandas sem dados ambíguos e com reprodução entre diferentes laboratórios (Carlson *et al.*, 1991; Bucci e Menozzi, 1995). Na definição do protocolo para reações de RAPD partindo-se do protocolo descrito por Ferreira e Grattapaglia (1998), alguns ajustes, como o aumento da concentração de magnésio para 3,0 mM, e o aumento de volume de reação de 13 para 20 μ L, foram de grande importância para o presente trabalho. No entanto, a definição de uma enzima *Taq* DNAPolimerase de boa qualidade, foi decisiva para amplificação de um bom número de bandas e com boa intensidade. Existem diferentes fabricantes que produzem a enzima, existindo variações quanto a qualidade da mesma entre um fabricante e outro, o que pode afetar a eficiência dessas enzimas nas reações de PCR. Outro aspecto importante na definição do protocolo foi a necessidade do uso de BSA, responsável pela estabilidade da enzima *Taq* DNAPolimerase nas reações, sem a qual nenhum dos testes realizados resultou na visualização de fragmentos amplificados.

O protocolo para marcadores AFLP, otimizado no presente trabalho, foi constituído pelas mesmas etapas descritas por Vos *et al.* (1995). A adaptação deste protocolo para utilização nas análises do alho constou basicamente da utilização dos iniciadores *Eco*RI sem a diluição recomendada pelo fabricante. A justificativa para tal deveu-se ao fato que a diluição desse iniciador gerou um número limitado de produtos de amplificação e com baixa nitidez. O uso deste iniciador sem diluição, além de amplificar bandas com excelente nitidez, produziu maior número de bandas de baixo peso molecular. A identificação de novas combinações de iniciadores, diferentes daqueles utilizados por Ipek e Simon (2001), foi também outro aspecto importante deste trabalho, já que poderão ser utilizados em trabalhos futuros de caracterização genética de alho.

Outro aspecto relevante no protocolo, diz respeito a coloração do DNA com nitrato de prata. O protocolo baseia-se na utilização de nitrato de prata como agente impregnante em meio ácido, e a redução da prata pelo formaldeído em meio alcalino. A prata reduzida se deposita sobre o DNA e, sob ação do carbonato de sódio, as bandas são visualizadas. Um problema verificado na coloração foi o “background” escuro formado no gel, dificultando a análise de bandas de mais fraca intensidade. Diversos autores tem discutido essa técnica buscando sua otimização com redução do problema citado. Segundo Stefenon (2003), o

sucesso da coloração do gel também está relacionado a fatores como: a quantidade dos reagentes, a qualidade da amplificação na PCR e a limpeza dos aparatos utilizados na coloração do gel. Reagentes de baixa pureza e aparatos contaminados com resíduos de coloração anteriores, detergentes ou outras substâncias acabam por aumentar o “background” por gerarem substratos para a deposição da prata sobre o gel. No presente trabalho, utilizou-se para coloração do DNA o protocolo descrito por Dantas (2002). A principal modificação feita diz respeito ao tempo de exposição dos produtos amplificados no nitrato de prata que passou de 20 para 35 minutos, tempo suficiente para a deposição desse reagente sobre os fragmentos de DNA, posteriormente visualizados em solução de carbonato de sódio.

Assim, este trabalho também trás uma significativa contribuição no que diz respeito a otimização tanto do protocolo de extração como de amplificação de DNA o que auxiliará as futuras análises genômicas desta espécie.

Marcadores moleculares baseados na análise direta da molécula de DNA têm sido pouco utilizados para detectar variações em Bancos de Germoplasma de alho. Dentre esses marcadores, o RAPD tem sido, notadamente, mais empregado neste tipo de estudo do que qualquer outro marcador molecular, sendo encontrado estudos com relativa freqüência na literatura. Os marcadores AFLP são outra classe de marcadores de natureza dominante extremamente informativa, desenvolvidos por Vos *et al.* (1995). Desde o advento desta técnica apenas um trabalho, realizado por Ipek e Simon (2001), reporta a utilização dos marcadores AFLPs para caracterização de Bancos de Germoplasmas de alho. Esta técnica tem como grande vantagem a capacidade de gerar um grande número de marcadores em uma única reação, com alto grau de repetibilidade dos padrões de banda obtidos (Vos *et al.*, 1995; Mueller e Wolfenbarger, 1999; Lerceteau e Szmidt, 1999).

Devido à natureza dominante dos marcadores RAPD e AFLP, o cálculo da diversidade genética é apresentado como de difícil mensuração em diversos trabalhos. Desse modo, alguns artefatos tem sido utilizados para a determinação da diversidade genética de populações estudadas, entre eles a determinação dos índices de variabilidade através do método de análise de variância molecular – AMOVA (Schmidt e Jansen, 2000), estimativa da divergência nucleotídica, a partir de valores conhecidos de F_{IS} (Chong *et al.*, 1994), utilizando-se tecidos de megagametófitos para realizar uma análise prévia e posteriormente inferir a heterozigosidade dos indivíduos amostrados (Bucci e Menozzi, 1995) e através do índice de Shannon, recentemente utilizado para estimar a diversidade genética de populações de *Araucária angustifolia* (Stefenon, 2003). Neste trabalho a diversidade genética foi estimada

apenas determinando-se os valores de similaridade genética entre os acessos de alho através do coeficiente de Jaccard e posterior análise de agrupamento pelo método UPGMA.

Dentre os 60 iniciadores testados para reações RAPD, 19 (32%) revelaram-se polimórficos. Desse total, apenas 10 (16,7%) foram utilizados na análise, por apresentarem bandas com boa intensidade, passíveis de serem interpretadas, reprodução das reações e ausência de ambigüidade na leitura das bandas. O número médio de bandas polimórficas por iniciador foi de 2,5. Este valor pode ser considerado baixo, se comparado com os relatados em outros trabalhos utilizando marcadores RAPD: 3,2 para *Allium sativum* e 4,6 para *Allium longicupis* (Bradley *et al.*, 1996), 3,3 para *Araucária angustifolia* (Stefenon, 2003), 4,2 para *Eucalyptus urophylla* (Pigato e Lopes, 2001), 5,0 para *Picea abies* (Bucci e Menozzi, 1995), 5,6 para *Populus tremuloides* (Chong *et al.*, 1994) e 3,0 para *Lycopersicon esculentum* (Rus-Kortekaas *et al.*, 1994).

Em estudo conduzido por Maass e Klaas (1995), 48 acessos de alho de diferentes espécies foram submetidos a análise RAPD. Os 15 iniciadores selecionados produziram um total de 135 bandas, sendo que dessas, 125 foram polimórficas, portanto, mais de 90% de polimorfismo. Tal polimorfismo parece ser extremamente alto quando se aplica esses marcadores para comparação de genótipos de diferentes espécies, sendo semelhantes as espécies de plantas férteis. Quando Wilkie *et al.* (1993) aplicou a análise RAPD em cebola e outras espécies de *Allium*, 17 dos 20 iniciadores usados revelaram polimorfismo em *Allium sativum* e *Allium ophioscorodon*, porém, praticamente todos os iniciadores detectaram polimorfismo entre as cultivares de cebola.

Em comparação com os estudos acima mencionados, o presente trabalho demonstrou que apesar do baixo número de bandas amplificadas, os marcadores RAPD foram eficientes, principalmente por terem apresentado resultados comparáveis aos proporcionados pelas isoenzimas e pelo nível de polimorfismo detectado entre os acessos analisados, o que permitiu a construção de agrupamentos similares aos produzidos por AFLPs.

O número total de bandas amplificadas por cada combinação AFLP utilizada variou entre 75 (*Eco* ACT + *Mse* CTA) e 128 (*Eco* ACC + *Mse* CAT), tendo o número de bandas polimórficas variado entre 13 (*Eco* ACT + *Mse* CTA) e 20 (*Eco* ACG + *Mse* CAG), valores correspondentes a 17,3% e 19% do total de bandas geradas por cada combinação, respectivamente. O tamanho das 48 bandas polimórficas geradas, variou entre 40 a 330 pares de base (pb). Utilizando o mesmo kit empregado neste trabalho, Ipek e Simom (2001) reportara valores superiores de número de bandas polimórficas amplificadas em três combinações diferentes das utilizadas neste trabalho. Foram geradas 180 bandas polimórficas

em um intervalo de tamanho de 67 a 457 pb. O maior número de bandas polimórficas reportadas por estes autores, pode estar relacionado ao fato de terem sido utilizados naquele trabalho, iniciadores de amplificação seletiva *Eco* RI com quatro extensões de nucleotídeos visando reduzir o número de bandas amplificadas, com o objetivo de diminuir o grau de ambigüidade e desse modo, efetuar a leitura das bandas com maior segurança.

O kit utilizado no presente trabalho é recomendado pelo fabricante para espécies de plantas com tamanho de genoma de 5×10^8 a 6×10^9 pb (Ipek e Simom (2001). Vale lembrar que o alho tem um genoma aproximadamente 3×10^{10} pb (Ranjekar *et al.*, 1978) e considerando que neste trabalho foram utilizados iniciadores *Eco* RI com apenas três bases seletivas, o resultado foi a amplificação de um grande número de bandas, sendo realizado a leitura apenas daquelas que não deixavam dúvida quanto a sua interpretação. Apesar do menor número de bandas polimórficas encontradas, em relação ao trabalho de Ipek e Simon (2001), consideramos que os resultados obtidos demonstraram uma excelente capacidade informativa da técnica AFLP em gerar informações a respeito do genoma de alho, sem a necessidade de aplicar um grande número de combinações de iniciadores.

De fato, os marcadores moleculares utilizados neste trabalho comprovaram sua eficiência, permitindo acessar uma maior quantidade do genoma do alho, o que possibilitou a caracterização mais eficiente dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma.

Os resultados obtidos a partir da análise de componentes principais permitem inferir que dez, dos 16 descritores morfológicos, contribuíram significativamente para a formação dos três eixos componentes principais, que explicam 64% da variação fenotípica total disponível. Nota-se que entre os descritores, apenas dois são de caráter quantitativo, peso do bulbo (PBU) e altura de plantas (APL). Este resultado contraria os obtidos por Menezes Sobrinho (1999), que relata nove variáveis quantitativas de maior valor, num total de 18 utilizadas, em estudo de caracterização morfológica de clones de alho.

O dendograma construído a partir do conjunto de dados morfológicos, resultou na formação de dois grandes grupos de acessos. Porém, a variabilidade observada em cada acesso comparativamente aos demais, entre elas a presença de haste floral, densidade foliar e ângulo de inserção da folha com o pseudo-caule, foi em parte devido ao ambiente do local, onde as

avaliações foram efetuadas, pois, a região apresenta características ambientais particulares e, portanto, o fenótipo desses acessos podem ser afetados quando cultivados em outras regiões com características ambientais diferentes. O alho apresenta elevada plasticidade fenotípica, ou seja, o mesmo genótipo ou clone pode apresentar variações morfológicas em respostas a interações com fatores ambientais, como solo, clima e umidade (Jones e Mann, 1983). Ilustrando, a cultivar Chonan quando cultivada em baixa altitude (abaixo de 300 m) não emite haste floral por ser um genótipo exigente em baixas temperaturas para floração. Assim, para que tais parâmetros possam ser aplicados de forma generalizada, deveriam ser mensurados novamente em outros ambientes.

Por essa razão, levando-se em consideração os caracteres morfológicos que indicaram maior correlação com as amostras analisadas, entre eles: formato transversal do bulbo (FTB), cor da túnica do bulbo (CTB) e largura da folha (LFO), e a experiência acumulada pela Epagri, o presente trabalho propôs um reagrupamento dos acessos crioulos, que poderá ter utilidade prática e uso rotineiro no manuseio dos acessos do BAG. Os mesmos parâmetros de diferenciação aqui aplicados foram utilizados nos trabalhos de Souza *et al.*, (1977 e 1978). No entanto, Menezes Sobrinho (1999), sustenta a importância do ângulo de inserção das folhas aos 90 dias após o plantio, como importante parâmetro na caracterização e distinção de clones de alho.

A partir do novo agrupamento (Tabela 4), pode-se observar três classes de variedades crioulas, onde apenas a variedade comercial Gigante associou-se a uma delas. Os demais acessos distribuíram-se em quatro grupos.

O grupo I apresenta acessos com bulbo codiforme, túnica de cor branca com estrias arroxeadas e bulbilhos rosados. A planta apresenta folhas de largura intermediária e porte semi-ereto. O grupo II é formado por acessos de bulbo circular, túnica de cor branca com estrias arroxeadas e bulbilhos arroxeados. As plantas apresentam folhas de largura intermediária e porte semi-ereto, que se dobram apenas nas extremidades. O grupo III é formado por acessos com bulbos pequenos, de formato circular, túnica de cor branca com estrias arroxeadas e bulbilhos rosados. As plantas apresentam folhas estreitas e arquitetura ereta. No grupo IV, os acessos nacionais incluídos nesse grupo caracterizam-se por apresentar bulbos de tamanho médio, formato codiforme, túnica de coloração pérola e bulbilhos de cor roxa, com leve variação de uma cultivar para outra, folhas intermediárias e porte semi-ereto se dobrando próximo as extremidades. O ciclo tardio e as características morfológicas do bulbo, notadamente a cor dos bulbilhos, fazem com que todas as cultivares representantes deste grupo

sejam consideradas nobres, (Menezes Sobrinho, 1978).

Analisando-se isoladamente as características morfológicas da parte aérea, a cultivar Contestado, também incluída no grupo IV, diferencia-se das demais por apresentar folhas mais largas e decumbentes. A cultivar Fuego/INTA, também incluída nesse grupo, difere das outras nas mesmas características citadas. Apresenta folhas de largura intermediária de porte ereto e ciclo comparativamente mais tardio. Isto é compreensível, considerando que trata-se de uma cultivar procedente da Argentina, recentemente introduzida no Brasil, mais exigente em fotoperíodo para bulbificação.

A cultivar Cará, representante do grupo V juntamente com a cultivar Chinesão, caracteriza-se pelo bulbo com formato chato, túnica do bulbo e bulbilhos de cor branca e folhas estreitas apresentando porte ereto. Estas características fazem com que esta cultivar seja considerada comum (Mueller *et al.*, 1985), sendo de grande importância para as regiões de baixa altitude do Estado de Santa Catarina por não apresentar exigência de frio.

Todas as cultivares introduzidas no Brasil, exceto Fuego/INTA e Chinesão, fazem parte do grupo VI. As variações morfológicas observadas entre as cultivares desse grupo dizem respeito principalmente ao aspecto foliar da planta. As cultivares chinesas Soft Steim e Hard Steim apresentaram características idênticas em praticamente todos os descritores avaliados, exceto alguma variação relacionada ao peso do bulbo. As cultivares Chinês/Arg e Chinês/Chi, também procedentes da China, apresentam traços morfológicos das folhas idênticos, porém, existem variações relacionadas a cor de bulbilhos. As cultivares Blanco e Colorado de origem Argentina, apresentam folhas de largura intermediária e decumbentes, diferenciando-se entre si pela coloração da túnica dos bulbilhos. Por fim, o grupo VII formado unicamente pelo alho-rei, da espécie *A. ampeloprasum*, apresenta características, tanto da parte aérea quanto dos bulbos, muito diferente dos acessos representativos da espécie *sativum*. O bulbo é grande, apresentando três a cinco bulbilhos grandes de coloração branca e as folhas são muito largas e decumbentes com algumas estrias roxas na superfície.

Os resultados obtidos a partir dos valores de heterozigosidade, encontrados na análise de isoenzimas, demonstram uma boa capacidade informativa desses marcadores na análise da diversidade genética em populações de alho, podendo ser indicado para este tipo de estudo.

Embora o número de locos alozimicos utilizados neste estudo tenha sido baixo, foi detectado um número expressivo de genótipos completamente homozigotos para os sete locos alozimicos. Geralmente, as plantas que se propagam vegetativamente, são de fecundação

cruzada, podendo apresentar um elevado índice de heterozigosidade. Contudo, este não é o caso do alho, em razão de que foi o grande número de cultivares comerciais de alho (8 de 20) que demonstraram homozigose nos sete locos alozimicos acessados.

Trabalhos anteriores com marcadores morfológicos (Siqueira *et al.*, 1985; Menezes Sobrinho, 1999) e com marcadores isoenzimáticos (Algustin e Garcia, 1993; Siqueira *et al.*, 1985; Pooler e Simon, 1993; Mass e Klass, 1995) empregados na caracterização genética de Bancos de Germoplasma de alho, foram utilizados como parâmetros de comparação da capacidade informativa dos sistemas isoenzimáticos utilizados neste estudo.

Os sete locos isoenzimáticos utilizados na análise genética das 20 cultivares de alho, detectaram níveis de similaridade que variaram de 33%, entre as cultivares Chinesão e Chinês/Arg, até 100% entre pares de cultivares brasileiras e chinesas, sugerindo com isso a possível ocorrência de genótipos duplicados ou quase isogênicos no Banco Ativo de Germoplasma.

Como a maioria das cultivares, exceto a cultivar Gigante, agruparam-se separadamente dos acessos crioulos na análise multivariada, é importante associar as análises isoenzimáticas com a análise multivariada, baseada nas características morfológicas dos acessos. Esta associação possibilitou uma nova configuração de agrupamento com a formação de seis grupos (Tabela 7). Os contrastes morfológicos existentes entre os acessos possibilitou estabelecer subgrupos dentro de dois dos seis grupos de similaridade, formados a partir dos sete locos isoenzimáticos.

O padrão “A” da isoenzima PGI-2 foi constante para todas as amostras nos seis grupos formados. A cultivar Chinesão, enquadrada isoladamente no grupo I, apresentou um único padrão isoenzimático homozigoto para todos os sistemas analisados. Esta cultivar apresenta bulbos grandes de formato codiforme, túnicas de coloração branca e película branca nos bulbilhos. As folhas são largas e apresentam porte decumbente, dobrando-se suavemente ao meio.

No grupo II aparecem as cultivares Cará, Russo, Hard Steim e Soft Steim. As cultivares Hard Steim e Soft Steim além de apresentarem todas as características morfológicas idênticas, vistas na análise multivariada, ainda compartilham 100% de seus marcadores isoenzimáticos. A cultivar Cará, agrupada juntamente com a cultivar Chinesão na análise morfológica, difere aqui da mesma cultivar pela presença do padrão “C” nas isoenzimas ACP, MDH e PGI-1. Este padrão poderia estar associado ao porte da folha ou formato de bulbo, já que as demais características foram idênticas.

O grupo III envolve as cultivares Roxo Caxiense, Fuego/INTA, Mexicano, Colorado, Contestado, Caçador-30, Caçador-40, Jonas, Chonan, Quitéria, Gigante e Blanco. Quando subdividido por traços morfológicos, nota-se que as cultivares nobres desse grupo, que são de grande expressão para as regiões produtoras no Sul do Brasil, agruparam-se igualmente a exemplo do que ocorreu na análise multivariada. As cultivares nacionais que compõem esse grupo foram situadas no mesmo grupo proposto por Augustin e Garcia (1993), para os padrões isoenzimáticos ACP, EST e PRX.

As cultivares Caçador-40 e Jonas, incluídas no subgrupo (b) do grupo III, são clones originados a partir da cultivar Caçador-30. É importante ressaltar que essas cultivares compartilham 100% de seus marcadores e apresentaram os mesmos traços morfológicos da parte aérea, porém, algumas variações no tamanho de bulbo. Nas observações feitas em ensaios realizados a campo, essas três cultivares apresentaram produtividades diferente, (Mueller *et al.*, 2000). Isto levou os melhoristas, envolvidos no trabalho de seleção, a concluírem sobre a ocorrência de uma provável mutação da cultivar para peso de bulbo.

A cultivar Gigante e Blanco isolaram-se nos subgrupos (c) e (d), respectivamente, em função das suas características específicas, tanto da parte aérea quanto as do bulbo. As cultivares Colorado e Mexicano, outra vez situaram no mesmo grupo. Apesar de apresentarem traços morfológicos similares, os padrões de isoenzimas revelados nessas duas cultivares são diferentes, sendo que para a cultivar Mexicano foi encontrado no sistema ACP e PGI-1, padrões “C” e “A”, respectivamente, e para cultivar Colorado, padrão “B” nos dois sistemas. O mesmo pode ser observado em relação as cultivares Roxo caxiense e Fuego/INTA que apresentaram um alto índice de similaridade ($>0,95$). Desde o início, quando foi introduzida a cultivar Fuego/INTA no Estado de Santa Catarina, as semelhanças morfológicas observadas entre essa cultivar e a cultivar nacional Roxo Caxiense, levou técnicos e produtores a creditarem que tratava-se da mesma cultivar, porém, com denominações diferentes. No entanto, neste trabalho, constatamos diferenças entre as cultivares, e essas diferenças podem estar relacionadas com a presença do padrão “C” de G2DH na cultivar Roxo Caxiense e ausência do mesmo padrão na cultivar Argentina.

As cultivares Fuego/INTA, Mexicano e Colorado, incluídas no subgrupo (a) do Grupo III apresentaram elevados índices de similaridade, variando de 0,81 a 0,97, com as cultivares do subgrupo (b) do mesmo grupo, onde estão incluídas a maioria das cultivares nacionais. Estes resultados indicam uma relação muito próxima entre as cultivares introduzidas da Argentina e México com as cultivares de maior expressão comercial no Brasil. Menezes Sobrinho (1978) relata em seu trabalho que a maioria das cultivares de alho cultivados no

Brasil poderia ser procedente do México, Egito e alguns países da América do Sul. Todavia, não há registros que tratam do período da sua entrada em nosso país.

O padrão “E” de G2DH e “D” de MDH e PGI-2 praticamente situa a cultivar Rei (*A. ampeloprasum*), isoladamente no grupo IV. Isto é compreensível, visto tratar-se de uma espécie diferente. Além do padrão isoenzimático encontrado somente nesta espécie, a planta difere morfológicamente das outras pelas mesmas características apresentadas na análise multivariada. Esse resultado corrobora com o de Siqueira *et al.*, (1985), que detectou padrão único de isoenzima para um clone da espécie *ampeloprasum*.

As cultivares chinesas, Chinês/Arg e Chinês/Chi, apesar de terem apresentado padrões eletroforéticos diferentes, não foi observado a campo nenhuma diferença quanto aos aspectos morfológicos da parte aérea. Os diferentes padrões de G6PDH, MDH e PGI-1 revelados para as duas cultivares, podem estar correlacionados com aspectos morfológicos dos bulbos, que apresentaram variações na coloração dos bulbilhos.

O maior grau de diferenciação entre os 20 acessos, verificado neste estudo em relação aos desenvolvidos por Augustin e Garcia (1993) e Siqueira *et al.* (1985), pode ser atribuído aos sistemas enzimáticos utilizados, à metodologia empregada e à maior variação genotípica das cultivares em foco. Nas análises desenvolvidas por Siqueira *et al.*, (1985), verificou-se sempre uma estreita associação entre os padrões, o que não foi observado neste trabalho. Exemplos como estes evidenciam a necessidade de aprofundamento nos estudos de caracterização genética de Bancos de Germoplasma de alho, porém, abrindo mão de técnicas com maior capacidade informativa.

A análise de agrupamento dos dados de RAPD foi comparável aquela produzida pelos AFLPs, tanto que, praticamente todos os acessos crioulos que compartilharam 100% de seus marcadores, exceto as cultivares comerciais Chinesão e Blanco, também compartilharam 100% de seus marcadores no dendograma gerado na análise AFLP. Os principais traços morfológicos indicados na análise de componentes principais e também associados aos marcadores isoenzimáticos para caracterização das 20 cultivares comerciais, mostraram uma tendência de agrupar-se com a maioria dos grupos de acessos, formados a partir dos marcadores RAPD e AFLP. Uma diferença notável foi que nove acessos do grupo IV, no dendograma RAPD, formaram o grupo I do dendograma AFLP, ficando fortemente separado dos demais grupos que incluem os acessos crioulos formado neste dendograma. Na análise RAPD os grupos de acessos crioulos estavam associados mais estreitamente, comparativamente ao que foi detectado pelos AFLPs.

A análise feita com a união dos marcadores RAPD e AFLP, mostrou uma estrutura de dendograma muito semelhante ao que foi apresentado na análise AFLP, principalmente com relação aos grupos contendo acessos crioulos. No reagrupamento feito a partir dos descritores morfológicos mais correlacionados com os acessos crioulos na análise de componentes principais, também foi observado a formação de três grupos desses acessos, com a diferença de que havia menor índice de similaridade genética entre os acessos, dentro de cada grupo.

As variações encontradas nesse tipo de análise, podem ter sido causadas por poucas modificações no DNA que causaram grandes efeitos fenotípicos, que foram captados pelos descritores morfológicos, mas não pelos moleculares, provavelmente pela baixa quantidade do genoma acessado. Além disso, a magnitude das diferenças entre os acessos também pode ter sido resultante da interação genótipo-ambiente. Realmente, a variação entre cultivares de alho é relativamente grande, e manifestam-se nos mais variados ambientes, podendo-se notar diferenças sensíveis no desenvolvimento da planta, comprimento e largura das folhas, ciclo da cultura, brotação prematura, conservação, conteúdo em sólidos solúveis, conformação, tamanho e cor do bulbo e, ainda, número, tamanho, forma e coloração dos bulbilhos.

Os agrupamentos das variedades comerciais foram similares quando formados por marcadores RAPD e AFLP, porém, os índices de similaridade encontrados entre alguns acessos no dendograma AFLP foi superior, mostrando a maior capacidade desse marcador para detectar diferenças entre os acessos. Por exemplo, as cultivares Colorado, Fuego/INTA e Roxo Caxiense, compartilharam 100% de suas bandas na análise RAPD, enquanto que a análise AFLP detectou variação entre as cultivares Fuego/INTA e Roxo Caxiense de 0,94, essas, suspeitas de serem genótipos duplicados com denominações diferentes. Essa mesma diferença, também revelada na análise com marcadores isoenzimáticos, morfológicos e confirmados na análise efetuada com os 95 marcadores RAPD e AFLP unidos, parece não deixar dúvidas com relação a divergência encontrada entre essas duas cultivares de origem diferente. Neste caso, as diferenças moleculares provavelmente não interferem na expressão fenotípica dos descritores morfológicos utilizados.

As cultivares Gigante, Cará, Blanco e Chinesão, agruparam-se em um dos grandes grupos dos acessos crioulos formados no dendograma RAPD, revelando índices de similaridade acima de 97% com estes grupos de acessos. Essa relação encontrada, principalmente entre as cultivares Chinesão e Blanco com os acessos crioulos no dendograma RAPD, é divergente daquela encontrada na análise AFLP, bem como na análise multivariada, onde elas estão mais associadas ao grupo de cultivares comerciais. No dendograma AFLP, a cultivar Chinesão apresentou 80% de similaridade no ponto de ligação com todos os outros

grupos do dendograma. Na análise das 20 cultivares comerciais, realizada com os marcadores isoenzimáticos, foi verificado para a cultivar Chinesão, um padrão único de isoenzimas em todos os sistemas analisados. Realmente, a diferença entre essas duas cultivares com os acessos crioulos, pode estar associada principalmente com as características morfológicas da planta, observadas em avaliações realizadas a campo, notadamente aquelas de maior relevância detectadas pela análise multivariada.

Tanto as cultivares Soft Steim e Hard Steim, como Quitéria e Jonas, apresentaram 100% de similaridade entre si, com o uso de ambos os marcadores RAPD e AFLP. Vale lembrar que, na análise com isoenzimas, para as duas primeiras cultivares citadas, já havia sido detectada tal grau de semelhança, que também foi elevado na análise multivariada de agrupamento. O resultado desta análise revelou a existência de características morfológicas idênticas em praticamente todos os descritores avaliados, para as duas primeiras cultivares, exceto algumas variações relacionadas ao tamanho do bulbo.

As cultivares Caçador-30 e Caçador-40 agruparam-se, apresentando 100% de similaridade nas análises isoenzimática e de RAPD, porém, a análise AFLP detectou variação entre essas duas cultivares. Essas variações moleculares podem estar associadas as pequenas diferenças observadas nos traços morfológicos do bulbo. Em ensaios realizados pela Epagri, envolvendo essas duas cultivares, foram detectados diferenças significativas com relação a produtividade das mesmas (Mueller *et al.*, 2003 – resultados não publicados). Já os acessos Jonas e Quitéria compartilham 100% das bandas RAPD e AFLP, no entanto, revelaram padrões eletroforéticos diferentes na análise de isoenzimas, apresentando pouco mais de 93% de similaridade genética e uma pequena divergência na análise multivariada de agrupamento. Essas pequenas diferenças, reveladas pelos marcadores morfológicos e isoenzimáticos, possivelmente estejam relacionados com alguns dos descritores influenciados pela ação do ambiente, possivelmente pela presença de haste floral (HFL) e forma de distribuição dos bulbilhos no bulbo (FDB) que, apesar de fortemente correlacionados com essas duas cultivares, suas médias apresentaram um elevado desvio padrão, e pelo reduzido número de locos isoenzimáticos analisados.

O dendograma oriundo da análise a partir da união dos marcadores RAPD e AFLP revelou uma estrutura muito semelhante ao dendograma gerado a partir da análise AFLP. No entanto, observa-se que houve uma separação mais efetiva entre as variedades crioulas e as variedades comerciais, exceto as variedades Cará e Gigante que apresentaram uma estreita ligação com os acessos crioulos em todas as análises realizadas neste trabalho.

A cultivar Gigante é, entre outras, uma cultivar de alho originada de variedades locais encontradas no Sul do Brasil (Biasi, 1998 - informação pessoal) e vem sendo recomendada, como alternativa de plantio para regiões de baixa altitude e com temperaturas elevadas do Estado de Santa Catarina, com boa aceitação entre os produtores. Neste trabalho ela apresentou-se fortemente associada com um pequeno grupo de acessos crioulos, em todas as análises apresentadas, exibindo 100% de similaridade com dois acessos, ora com 767 e ora com 815, nas análises RAPD e AFLP, respectivamente. No entanto, as características morfológicas relacionadas ao bulbo e a coloração dos bulbilhos, divergem entre a cultivar Gigante e os acessos crioulos 767 e 815. A cultivar Gigante apresenta bulbo grande com bulbilhos arroxeados, diferentes das duas variedades crioulas que apresentam bulbos de tamanho médio e bulbilhos com película branca.

A ausência de variação interclonal, revelada entre vários acessos nas análises feitas com marcadores moleculares, sobretudo na análise com os 95 marcadores RAPD e AFLP agrupados, e levando-se em consideração as semelhanças nos principais traços morfológicas entre tais acessos, pode sustentar nossa hipótese inicial de que existe acessos duplicados no Banco Ativo de Germoplasma de alho de Santa Catarina. É relevante mencionar ainda que, as análises incluíram amostras de DNA de duas plantas, para cada uma das 20 cultivares comerciais, e a falta de variação intraclonal e interclonal, para alguns pares de acessos, reforça esta hipótese. Virk *et al.*, (1995) sugeriram que dois indivíduos, apenas poderiam ser provados como idênticos, se seus genomas inteiros fossem seqüenciados. Desde então, é consenso entre vários autores, que uma decisão para que dois acessos de alho sejam tomados como geneticamente idênticos só poderia ser feita através do uso das técnicas de discriminação mais eficientes disponíveis. Virk *et al.*, (1995) relatam ainda que, 86 marcadores RAPD poderiam ser suficientes para designar dois acessos de arroz como geneticamente idênticos com 99% de confiabilidade. Se este for critério aceitável e considerando que 95 marcadores moleculares foram utilizados neste trabalho, poder-se-ia concluir que pelo menos 25 acessos crioulos que compõem os Banco Ativo de Germoplasma de alho de Santa Catarina são geneticamente diferentes entre si e dos demais acessos. Considerando o mesmo critério, as cultivares Soft Steim e Jonas, também poderiam ser consideradas como acessos duplicados no Banco de Germoplasma. O restante (51) dos acessos crioulos deveriam ser submetidos a uma nova análise genômica mais ampla.

Para estabelecer uma comparação mais objetiva, matrizes de valores cofenéticos, geradas pelos dendogramas a partir de marcadores de isoenzimas, RAPD e AFLP, foram comparadas duas a duas, usando o teste de Mantel. A correlação entre os dendogramas RAPD

e AFLP foi de 0,89, indicando um alto nível de concordância entre os dois marcadores, para agrupamento de acessos de alho. Uma boa harmonia entre as análises RAPD e AFLP na caracterização da diversidade genética também foi relatada em melão (Garcia-Mas *et al.*, 2000), arroz (Virk *et al.*, 2000), alho (Ipek e Simon, 2001) e pimenta (Lefevre *et al.*, 2001). Ipek e Simon (2001) compararam a capacidade informativa dos marcadores RAPDs, AFLPs e isoenzimas para estudar a diversidade genética de uma coleção de alho, provenientes de várias regiões do mundo. Detectaram, pelo teste de Mantel, uma correlação de 0,96 entre os marcadores RAPD e AFLP, indicando uma alta concordância para esses marcadores. De forma geral, a análise de agrupamento com os dados de isoenzimas, foi comparável às análises de RAPD e AFLP. O teste de Mantel indicou neste trabalho, uma correlação entre os dendogramas de isoenzimas e RAPD de 0,54 e entre Isoenzimas e AFLP de 0,64. Apesar de serem relativamente baixos, os valores foram considerados significativos pelo teste de Mantel. Estas correlações são superiores as que foram detectadas no trabalho de Ipek e Simon (2001), de 0,55 entre isoenzimas e AFLP e 0,57 entre isoenzimas e RAPD. Acredita-se que as correlações estabelecidas neste trabalho, poderiam ser melhoradas caso um maior número de locos isoenzimáticos tivessem sido analisados.

Devido a metodologia estatística adotada neste estudo, não foi possível estabelecer este tipo de correlação entre os dendogramas gerados a partir dos marcadores isoenzimáticos, RAPD e AFLP, com o dendograma gerado na análise de agrupamento a partir dos descritores morfológicos. Contudo, considerando o padrão de estrutura, relativamente homogênea, encontrado nos quatro dendogramas, pode-se concluir que há uma considerável semelhança entre eles.

CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Com base nos resultados obtidos e considerando as hipóteses levantadas e objetivos propostos, as principais conclusões do presente trabalho foram:

- Os descritores morfológicos cor da túnica do bulbo, arquitetura da planta, largura da folha, cor da túnica dos bulbilhos, formato transversal do bulbo e altura da planta são os mais adequados para a caracterização e distinção dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma de alho de Santa Catarina;
- Considerando-se tratar de uma espécie de propagação praticamente assexuada, os valores de heterozigosidade encontrados na análise de isoenzimas, sugerem que existe uma quantidade razoável de variabilidade genética entre os acessos do Banco Ativo de Germoplasma de alho, demonstrando uma boa capacidade informativa desses marcadores na análise da diversidade genética em populações de alho, podendo ser indicado para este tipo de estudo;
- O sistema isoenzimático G2DH, foi adaptado pela primeira vez, e significa avanços no estudo da diversidade genética de *Allium sativum* e *Allium ampeloprasum*, já que existem poucos sistemas identificados para essas espécies;
- As adaptações e otimizações realizadas neste trabalho permitiram a obtenção de protocolos específicos para análise genética de *Allium sativum* e *Allium ampeloprasum* através de marcadores moleculares RAPD e AFLP;
- O número de bandas polimórficas amplificadas pelos marcadores RAPD e AFLP foi relativamente baixo, porém, ambos métodos mostraram-se adequado na caracterização genética do alho;
- A associação dos resultados obtidos pela análise dos marcadores morfológicos, isoenzimáticos e moleculares possibilita a classificação das cultivares comerciais, de origem nacional e introduzidas, em sete grupos de similaridade, considerando o índice de 0,93 em todas as análises efetuadas;
- A análise com os 95 marcadores moleculares unidos, indica que dos 76 acessos de alhos crioulos do Banco Ativo de Germoplasma de Santa Catarina, pelo menos 25 são geneticamente diferentes entre si. Com base nos mesmos marcadores, os pares de cultivares

comerciais Soft Steim e Hard Steim, Quitéria e Jonas, também poderiam ser considerados duplicados. No entanto, outros marcadores não suportam esta hipótese para o segundo par;

- A hipótese levantada sobre a possibilidade das cultivares Roxo Caxiense e Fuego/INTA serem o mesmo genótipo, com denominações diferentes em locais diferentes, não se confirmou, de acordo com as análises a que foram submetidas essas cultivares neste trabalho.

- Os índices de similaridade revelados pelos marcadores RAPD e AFLP, foram geralmente altos para todos os acessos, comparativamente aos encontrados nas análises morfológicas e isoenzimáticas. Porém, além da análise AFLP ter revelado maior polimorfismo, com um número reduzido de combinações de iniciadores, o agrupamento dos 96 acessos foi mais coerente com aquele formado a partir dos descritores morfológicos, sendo, portanto, considerada neste trabalho, a técnica mais indicada para a detecção de polimorfismo em alho.

As descrições de cultivares de alho, a nível nacional, geralmente são incompletas e realizadas com distintos critérios, criando situações confusas quando se pretende fazer uma análise comparativa. O nível de especificidade de um genótipo, no manejo ao qual se submete, restringe em muito a inferência de resultados específicos para outras condições. Quando isto é feito, a caracterização se comporta como equivocada, tornando as informações pouco úteis, exceto para o próprio local.

Neste trabalho, procurou-se associar os métodos freqüentemente utilizados para caracterização genética de coleções de germoplasma de alho com as técnicas moleculares disponíveis para este tipo de estudo, visando obter um grau de segurança maior na recomendação desses genótipos, para atender as diversas regiões climáticas do Estado de Santa Catarina e do Brasil.

Contudo, os resultados, notadamente aqueles relacionados aos parâmetros morfológicos, são oriundos de uma região com características ambientais intrínsecas, e, portanto, devem ser tomados com cautela. Desta forma, recomenda-se que a Epagri de continuidade a esta linha de pesquisa, com o estabelecimento de ensaios de longa duração em diferentes condições de solo e clima, visando identificar o nível de variações da interação genótipo ambiente dos acessos avaliados, para futuramente recomendar os resultados deste trabalho com maior segurança.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**, Viçosa: UFV, 1991. 242 p.
- Al-ZAHIM, M., H. J. NEWBURY, and B. V. FORD-LLOYD. 1997. Classification of genetic variation in garlic (*Allium sativum* L.) revealed by RAPD. **HortScience** 32:1102-1104.
- AUGUSTIN, E.; GARCIA, A . 1993. Classificação isoenzimática, morfológica e agrônômica de genótipos de alho. **Horticultura Brasileira**. v. 11, n. 01, p. 10.
- BARBOSA NETO, J.F.; SORRELS, M.E.; CISAR, G. 1996. Prediction of heterosis in wheat using coefficient of parentage and RFLP based estimates of genetic relationship. **Genome** 39: 1142-1149.
- BIASI, J.; MUELLER, S. 1989. Comportamento de cultivares de alho no Planalto Catarinense. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.7, n.1, p.7-9.
- BRADLEY, K. F., M. A. RIEGER, and G. G. COLLINS. 1996. Classification of Australian garlic cultivars by DNA fingerprinting. **Aust. J. Exp. Agric.** 36:613-618.
- BUCCI, G.; MENOZZI, P. Genetic variation of RAPD markers in a *Picea abies* Karst population. **Heredity**, 75:188-197, 1995.
- BURBA, J.L. 1993. Obtencion de nuevas variedades de ajo. In: **Curso/Taller sobre Producción, Comercialización e Industrialización de Ajo**. (3, 1993, Mendoza). Mendoza, INTA. EEA La Consulta. P. 45-48.
- BURBA, J.L.; ALEMANY, L. 1988. Estudio Preliminar de Descriptores Morfológicos para Caracterizacion de Bancos de Germoplasma de Ajo (*Allium sativum* L.). **Horticultura Argentina**. 7 (15): 65-70.
- CARLSON, J. E.; TULSIERAM, L. K.; GLAUBITZ, J. C.; LUK, V. W. K.; KAUFFELDT, C.; RUTLEDGE, R. Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. **Theoretical and Applied Genetics**, 83:194-200, 1991.

CHALHOUB, B.A.; THIBAUT, S.; LAUCOU, V.; RAMEAU, C.; HOFTE, H.; COUSIN, R. Silver staining and recovery of AFLP™ amplification products on large denaturing polyacrylamide gels. **BioTechniques**, v.22, n.2, p. 216-220, 1997.

CHAPARRO, J.X.; WERNER, D.J.; O'MALLEY, D.; SEDEROFF, R.R. Target mapping and linkage analysis of morphological isozyme, and RAPD markers in peach. **Theoretical and Applied Genetics**, v.87, p.805-815, 1993.

CHELIAK, W. N.; PITTEL, J. A. **Techniques for starch gel eletrophoresis of enzymes from forest tree species**. Pataya National Forestry Institute, Canadian Forestry Service Information Report PI-X-42, 1984. 49 p.

CHONG, D. K. X.; YANG, R.; YEH, F. C. Nucleotide divergence between populations of trembling aspen (*Populus tremuloides*) estimated with RAPDs. **Current Genetics**, 00:374-376, 1994.

CRESTE, S.; TULMANN-NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.1-8, 2001.

CRISTOFANI, M.; MACHADO, M.A.; GRATTAPAGLIA, D. Genetic linkage maps of *Citrus sunki* Hort. ex. Tan. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. And mapping of *citrus* tristeza virus resistance gene. **Euphytica**, v.109, p.25-32, 1999.

DAL BÓ, M. **Genetic mapping, qtl analysis and marker-assisted selection for disease resistance loci in grapes**. Cornell, 1998. 120p. Thesis (Ph.D.) - Cornell University.

DANTAS, A. C. M. **Utilização de marcadores moleculares e bioquímicos e técnicas de cultura de tecidos para o melhoramento genético de *Mallus domestica***. Pelotas, 2002 {Tese de Doutorado – Universidade Federal de Pelotas}

ETOH, T. 1980. **An attempt to obtain binucleat pollen of garlic (*Allium sativum* L.)** Memolrs of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University, v. 16, n. 25, p. 65-73.

ETOH, T.; OGURA, H. 1977. **A morphological observation on the formation of abnormal flowers in garlic (*Allium sativum* L.)** Memoirs of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University, v. 13, n. 22, p. 77-88.

ETOH, T. 1982. **Development and degeneration of the tapetum in garlic, *Allium sativum* L.** Mem. Fac. Agr. Kagoshima University 18: 75-84.

ETOH, T. 1983. **Accomplishment of microsporogenesis in a garlic clone.** Memoirs of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University, v. 19, p. 55-63.

ETOH, T. 1985. **Studies on the sterility in garlic, *Allium sativum* L.** Mem. of the Fac. Agr. Kagoshima University 21: 77-132.

FERRAZ, E.M.; GANDARA, F. B.; CUNHA, N. L.; REIS, M. S.; KAGEYAMA, P. Y. **Eletroforese de isoenzimas para espécies arbóreas – Manual de Laboratório (versão 1994).** Piracicaba, ESALQ/Departamento de Ciências Florestais/Laboratório de Biologia Reprodutiva e Genética de Espécies Arbóreas. 1994. 23 p.

FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. 1998. **Introdução ao uso de Marcadores Moleculares.** 3 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 220 p.

GARCIA MAS, J.; OLIVER, M.; GOMES PANIAGUA, H.; VICENTE, M. C. de. Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. **Theoretical and Applied Genetics.** 101:869-864, 2000.

GOULÃO, L.; CABRITA, L.; OLIVEIRA, C.M.; LEITÃO, J.M. Comparing RAPD and AFLP analysis in discrimination and estimation of genetic similarities among apples (*Malus domestica* Borkh.) cultivars. **Euphytica**, v. 119, p. 259-270, 2001.

HEMMAT, M.; WEEDEN, N.F.; CONNOR, P.J.; BROWN, S.K. A DNA marker for columnar growth habit in apple contains a simple sequence repeat. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.122, p.347-349, 1997.

HARVEY, M.J. Onion and other cultivated Alliums. In: SMARTT & SIMONDS. 1995. **Evolution of Crop Plant.** 2nd ed. p. 445-448. London-England.

IKETANE, H.; ABE, K.; YAMAMOTO, T.; KOTOBUKI, K.; SATO, Y.; SAITO, O.T.; MATSUTA, N.; HAYASHI, T. Mapping of disease-related genes in japanese pear using molecular linkage map with RAPD markers. **Breeding Science**, v.51, p. 179-184, 2001.

INSTITUTO CEPA/SC. 2001. **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina.** Florianópolis, SEDRA.

IPGRI. 2001. Descriptors for *Allium* (*Allium spp*). **International Plant Genetic Resources Institute**, Rome, Italy.

IPEK, M., SIMON, P.W. 2001. Comparison of AFLPs, RAPD Markers and Isozymes for Diversity Assessment of Garlic and Detection of Putative Duplicates in Germoplasm Collections. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. 128(2): 246-252.

JONES, N. ; OUGHAM, H.; THOMAS, H. 1997. Markers and mapping: we are all geneticists now. **New Phitol.**, v. 137, p. 165-177.

JONES, H.A.; MANN, L.K. Onions and their allies: botany, cultivation and utilization. New York, **Interscience Publishers**, Inc. 1983. 286 p.

KASHKUSH, K.; FANG, J.; TOMER, E.; HILLEL, J.; LAVI, U. Cultivar identification and genetic map of mango (*Mangifera indica*). **Euphytica**, v.122, p.129-136, 2001.

KEPHART, S. R. Starch gel eletrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. **American Journal of Botany**. 77(5):693-712, 1990

KONVIKA, O. 1973. The causes of sterility in *Allium sativum* L. **Biologia Plantarum** (Praha) 15(2): 144-149.

KONVICKA, O.; NIENHOUS, T.; FISCHBEK, G. 1978. Investigations into the causes of pollen sterility in *Allium sativum* L. L.Z. **Pflanzenzuchtg**, v. 80, p. 265-276.

KOUL, A.K.; GOHIL, R.N. 1970. Causes averting sexual reproduction in *Allium sativum* L. **Cytologia** 35: 197-202.

KREBS, C.J. 1998. Ecological Methodology. 2nd ed. p. 375-383. California, USA.

LEFEBVRE, V.; GOFFINET, B.; CHAUVET, J. C.; CAROMEL, B.; SIGNORET, P.; BRAND, R.; PALLOIX, A. Evaluation of genetic distances between pepper inbred lines for cultivar protection purposes: Comparison of AFLP, RAPD and phenotypic data. **Theoretical and Applied Genetics**. 102:741-750, 2001.

LERCETEAU, E.; SZMIDT, A. E. Properties of AFLP markers in inheritance and genetic diversity studies of *Pinus sylvestris* L. **Heredity**, 82:252-260, 1999.

LISCUM, M.; OELLER, P. 2001. Selective restriction fragment amplification. Disponível em: < <http://carnegiedpb.stanford.edu/methods/aflp> >. Acesso em: 10 jul. 2002.

- McCOLLUM, G.D., 1976. Onion and allies. In: N.W. Simmonds (Ed.). **Evolution of Crop Plants**, pp 186-190. Longman, New York.
- MASCARENHAS, M.H.T. 1978. Clima, cultivares, épocas de plantio e alho planta. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v.4,n.48, p.15-24.
- MAASS, H. I. and M. KLAAS. 1995. Intraspecific differentiation of garlic (*Allium sativum* L.) by isozyme and RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**. 91:89-97.
- MENEZES SOBRINHO, J. A.; CHARCHAR, J. M.; ARAGÃO, F. A. S. 1999. Caracterização morfológica de germoplasma de alho por análises multivariada componentes principais e variáveis canônicas. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 2, p. 96 - 101.
- MENESES SOBRINHO, J.A . 1978. Pragas do alho. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, 4(48): 41-44.
- MUELLER, S.; BIASI, J.; VIEIRA, R. L. Avaliação de cultivares para o Estado de Santa Catarina 2001/2002. **Epagri**, Florianópolis, p. 7-10. 2000, (Epagri, Boletim Técnico, 120).
- MUELLER, S.; BIASI, J.; VIEIRA, R. L. Avaliação de introduções de alho crioulo no Estado de Santa Catarina. **Epagri**, 2001, (Relatório de projeto de pesquisa, não publicado).
- MUELLER, S.; BIASI, J.; VIEIRA, R. L. Avaliação de introduções de alho crioulo no Estado de Santa Catarina. **Epagri**, 2002, (Relatório de projeto de pesquisa, não publicado).
- MUELLER, U. G. & WOLFNBERGER, L. L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. **Tree**. v. 14, n. 10. p. 389-394.
- NEI, M. Molecular evolutionary genetics. **Columbia University Press**. 1987. 512p.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, 70(12): 3321-3. 1973.
- NEI, M.; Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, 89: 583-590. 1978.
- NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Ann. Human. Genet.**, 41:225-33. 1977.

NOVAK, F.J. 1972. Tapetal development in the anthers of *Allium sativum* L. and *Allium longicuspis*. L.Z. **Pflanzenzchtung**, 84: 250-260.

PELEMAN, J.; KULPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids. Research*, v.23, n.1, p.4407-4414, 1995.

PIGATO, S. M. P. C.; LOPES, C. R. Caracterização silvicultural, botânica e avaliação da variabilidade genética por meio do marcador molecular RAPD em um teste de progênes de *Eucaliptus urophylla* S. T. Blake. **Scientia Forestalis**, 60:135-148, 2001.

POOLER, M.R.; SIMON, P.W. 1993. Characterization and classification of isozyme and morphological variation in a diverse collection of garlic clones. **Euphytica**, v. 68, n. 2, p. 121-130.

POOLER, M.R.; SIMON, P.W. 1993. Garlic flowering in response to clone, photoperiod, growth temperature, and cold storage. **Hort Science**, v. 28, n. 1, p. 1085-1086.

RANJECKAR, P. K.; PALLOTTA, D.; LAFONTAINE, J. G. Analysis of plant genomes. Comparative study of molecular properties of DNAs of seven *Allium* species. **Biochem Genetics**. 16:957-970, 1978.

ROHLF, F. J. 1990. NTSYS-PC: Numerical taxonomy and multivariate analysis. New York, **Applied Biostatistics inc.**, 139p.

RUS-KORTEKAAS, W.; SMULDERS, M. J. M.; ARENS, P.; VOSMAN, B. Direct comparison of levels of genetic variation in tomato detected by a GACA-containing microsatellite and by random amplified polymorphic DNA. **Genome**, 37:375-381, 1994.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York. 1989.

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

SCHMIDT, K.; JENSEN, K. Genetic structure and AFLP variation of remnant populations in the rare plant *Pedicularis palustris* (Acrophulariaceae) and its relation to population size and reproductive components. **American Journal of Botany**, 87(5):678-689, 2000.

SOUZA, R. J. de; MASCARENHAS, M. H. T.; SATURNINO, H. M.; LARA, J. F. R. Caracteres morfológicos de 18 cultivares de alho (*Allium sativum* L.). In: **Projeto de Olericultura**; relatório anual 75/76, Belo Horizonte, EPAMIG, 1977. p. 39-43.

SOUZA, R. J. de; MASCARENHAS, M. H. T.; SATURNINO, H. M.; LARA, J. F. R. Caracteres morfológicos de 17 cultivares de alho (*Allium sativum* L.). In: **Projeto de Olericultura**; relatório anual 76/77, Belo Horizonte, EPAMIG, 1978. p. 34-37.

STEFENON, V. M. **Adaptação e otimização de protocolos para a extração de DNA e para marcadores RAPD e AFLP e transferibilidade de iniciadores para marcadores microssatélites em *Araucária angustifolia***. Florianópolis, 2003 {Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina}

SWOFFORD, D. L.; SELANDER, R. B. Biosys-2. A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. Release 1.7. **Natural History Survey**, Illinois. 1989. 43 p.

TAKENAKA, Y. 1933. Further reports of the cytological investigations on the sterile plant. **J. Chosen Natural Hist. Soc.** 12: 25-41

TESTOLIN, R.; HUANG, W.G.; LAIN, O.; MESSINA, R.; VECCHIONE, A.; CIPRIANI, G. A kiwifruit (*Actinidia* spp.) linkage map based on microsatellites and integrated with AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 203, p. 30-36, 2001.

VIEIRA, E.A. **Mapeamento genético da ameixeira (*Prunus* sp.) com base em uma população segregando para resistência a escaldadura das folhas (*Xylella fastidiosa*)**. Dissertação de Mestrado (Recursos Genéticos), 2002, 91p.

VIRK, P. S.; NEWBURY, H. J.; JACKSON, M. T.; FORD-LLOYD, B. V. The identification of duplicate accessions within a rice germplasm collection using RAPD analysis. **Theoretical and Applied Genetics**. 90:1049-1055, 1995.

VIRK, P. S.; ZHU, J.; NEWBURY, H. J.; BRYAN, G. J.; JACKSON, M. T.; FORD-LLOYD, B. V. Effectiveness of different classes of molecular marker for classifying and revealing variation in rice (*Oryza sativa*) germplasm. **Euphytica** 112:275-284, 2000.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. V.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KULPER, M.; ZABEAU, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 1, p. 4407-4414.

WEEDEN, N.F.; TIMMERMAN, G.M.; LU, J. 1994. Identifying and mapping genes of economic significance. **Euphytica** 73: 191-198.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, 18(24):7213-7218, 1990.

WILKIE, S. E.; ISAAC, P. G.; SLATER, R. J. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. **Theoretical and Applied Genetics**. 86:497-504, 1993.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBERLIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18(22):6531-6535, 1990.

XLSTAT, versão 7.0/2003 (<http://www.xlstat.com/demoe.htm>) acessado em 20/02/2004.

ZEBEAU, M. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. **European Patent Application**; N.º 0534858 A1. 1993.

ANEXOS

Anexo 1. Identificação, ano de coleta, origem e características morfológicas de acessos crioulos do Banco Ativo de Germoplasma de alho de Santa Catarina (Florianópolis-SC, Epagri/CCA/UFSC, 2003).

Identificação	espécie	Ano de coleta	Procedência (município)	Tempo de cultivo na propriedade	Características gerais da planta (relatadas pelo produtor)
744	<i>A. sativum</i>	1999	Concodia-SC	20 anos	Folha estreita, bulbo branco com dentes brancos
747	<i>A. sativum</i>	1999	Arabutão-SC	40 anos	Folha estreita, bulbo branco com dentes brancos
748	<i>A. sativum</i>	1999	Arabutão-SC	40 anos	Folha larga , bulbo bege e dentes brancos
750	<i>A. sativum</i>	1999	Ipumirim-SC	50 anos	Folha verde intensa, bulbo arroxeadado, dente roxo
751	<i>A. sativum</i>	1999	Ipumirim-SC	15 anos	Folha verde intensa e bulbo arroxeadado
756	<i>A. sativum</i>	1999	Lindóia do Sul-SC	2 anos	Folha estreita, bulbo branco com dentes brancos
761	<i>A. sativum</i>	1999	Lindóia do Sul-SC	40 anos	Folha estreita, bulbo branco e dentes brancos
766	<i>A. sativum</i>	1999	Lindóia do Sul-SC	40 anos	Folha verde escura, bulbo branco e dentes roxo
767	<i>A. sativum</i>	1999	Itá-SC	50 anos	Folha verde intensa e bulbo arroxeadado
770	<i>A. sativum</i>	1999	Seara-SC	Muitos	Folha estreita, bulbo branco com dentes brancos
768	<i>A. sativum</i>	1999	Seara-SC	25 anos	Folha verde intensa e bulbo arroxeadado
773	<i>A. sativum</i>	1999	Xavantina-SC	30 anos	Folha verde escura, bulbo bege e dentes brancos
774	<i>A. sativum</i>	1999	Xavantina-SC	30 anos	Folha estreita, bulbo branco com dentes rosados
776	<i>A. sativum</i>	1999	Xavantina-SC	-	Folha verde escura, bulbo bege e dentes brancos
777	<i>A. sativum</i>	1999	Xavantina-SC	30 anos	Folha estreita, bulbo branco com dentes brancos

Continuação

778	<i>A. sativum</i>	1999	Seara-SC	20 anos	Folha estreita, bulbo branco com dentes brancos
780	<i>A. sativum</i>	1999	Alvoredos-SC	-	Folha estreita, bulbo branco com dentes brancos
782	<i>A. sativum</i>	1999	Chapecó-SC	-	Folhas estreitas bulbo branco e dentes arroxeados
783	<i>A. sativum</i>	1999	São Carlos-SC	-	Folha estreita, bulbo branco com dentes brancos
787	<i>A. sativum</i>	1999	São Caelos-SC	-	Folha estreita, bulbo branco e dentes arroxeados
788	<i>A. sativum</i>	1999	Mondai-SC	-	Folha estreita, bulbo branco com dentes brancos
789	<i>A. sativum</i>	1999	Mondaí-SC	-	Folha estreita, bulbo branco com dentes rosados
790	<i>A. sativum</i>	1999	Mondai-SC	-	Folha larga, bulbo branco com dentes brancos
791	<i>A. sativum</i>	1999	São L. do Oeste-SC	-	Folha estreita, bulbo branco com dentes brancos
798	<i>A. sativum</i>	1999	São L. do Oeste-SC	-	Folha estreita, bulbo bege com dentes rosados
799	<i>A. sativum</i>	1999	São João do Sul-SC	-	Folha estreita, bulbo branco com dentes brancos
800	<i>A. sativum</i>	1999	São João do Sul-SC	-	Folha estreita, bulbo bege com dentes rosados
801	<i>A. sativum</i>	1999	Itapiranga-SC	30 anos	Folha estreita, bulbo bege com dentes rosados
802	<i>A. sativum</i>	1999	Itapiranga-SC	30 anos	Folhas estreitas bulbo branco e dentes arroxeados
807	<i>A. sativum</i>	1999	Descanso-SC	14 anos	Folhas estreitas bulbo branco e dentes arroxeados
808	<i>A. sativum</i>	1999	S. M. D'Oeste-SC	16 anos	Folha estreita, bulbo bege com dentes brancos
809	<i>A. sativum</i>	1999	Barracão-SC	30 anos	Folhas estreitas bulbos brancos e dentes arroxeados
813	<i>A. sativum</i>	1999	Flor do Sertão-SC	30 anos	Folha larga, bulbo pérola com dentes rosados
814	<i>A. sativum</i>	1999	Flor do Sertão-Sc	8 anos	Folha estreita, bulbo bege com dentes bege
815	<i>A. sativum</i>	1999	Maravilha-SC	32 anos	Folha estreita, bulbo branco com dentes arroxeados
816	<i>A. sativum</i>	1999	Iraceminha-SC	15 anos	Bulbo branco com dentes arroxeados

Continuação

819	<i>A. sativum</i>	2000	Monte Castelo-SC	10 anos	Folha estreita, bulbo bege com dentes rosados
821	<i>A. sativum</i>	2000	Pinhalzinho-SC	30 anos	Bulbo branco com dentes arroxeados
822	<i>A. sativum</i>	1999	Nova Erechim-SC	12 anos	Bulbo branco com dentes arroxeados
823	<i>A. sativum</i>	2000	Matos Costas-SC	30 anos	Folha larga, bulbo bege com dentes rosados
824	<i>A. sativum</i>	2000	Porto União-SC	30 anos	Bulbo branco com dentes arroxeados
825	<i>A. sativum</i>	2000	União da Vitória-PR	10 anos	Folha verde escura, bulbo branco e dente rosado
826	<i>A. sativum</i>	2000	Palmas-PR	-	Bulbo branco com dentes arroxeados
827	<i>A. sativum</i>	2000	Rio Negrinho-SC	5 anos	Bulbo branco com dentes rosados
828	<i>A. sativum</i>	2000	Major Vieira-SC	10 anos	Bulbo branco com dentes arroxeados
830	<i>A. sativum</i>	2000	São Bento do Sul-S	-	Bulbo branco com dentes arroxeados
831	<i>A. sativum</i>	2000	Irineópolis-SC	10 anos	Folha larga, bulbo bege com dentes rosados
832	<i>A. sativum</i>	2001	Ituporanga-SC	-	Bulbo branco com dentes arroxeados
833	<i>A. sativum</i>	2001	Rio do Sul-SC	30 anos	Folha média, bulbo branco com dentes brancos
834	<i>A. sativum</i>	2000	Pinheiro Preto-SC	15 anos	Folha larga, bulbo branco com dentes rosados
835	<i>A. sativum</i>	2000	Tangará-SC	40 anos	Folha larga, bulbo branco com dentes brancos
836	<i>A. sativum</i>	2000	Tangará-SC	40 anos	Folha larga, bulbo branco com dentes rosados
840	<i>A. sativum</i>	2000	Luzerna-SC	10 anos	Folha larga, bulbo branco com dentes brancos
841	<i>A. sativum</i>	2000	Erval D'Oeste-SC	25 anos	Folha larga, bulbo branco com dentes brancos
842	<i>A. sativum</i>	2000	Piratuba-SC	15 anos	Folha larga, bulbo roxo com dentes rosados
845	<i>A. sativum</i>	2000	Piratuba-SC	10 anos	Folha larga, bulbo branco com dentes brancos
846	<i>A. sativum</i>	2000	Ouro-SC	15 anos	Folha larga, bulbo roxo com dentes rosados

Continuação

847	<i>A. sativum</i>	2000	Ouro-SC	15 anos	Folha média, bulbo branco com dentes rosados
848	<i>A. sativum</i>	2000	Ouro-SC	15 anos	Folha média, bulbo bege com dentes rosados
850	<i>A. sativum</i>	2000	Lacerdópolis-SC	25 anos	Folha verde escura e bulbo roxo e dentes rosados
851	<i>A. sativum</i>	2000	Lacerdópolis-SC	25 anos	Folha verde escura e bulbo arroxeadado e dente roxo
852	<i>A. sativum</i>	2000	Arroio Trinta-SC	9 anos	Folha larga, bulbo bege com dentes branco
854	<i>A. sativum</i>	2000	Arroio Trinta-SC	9 anos	Folha larga, bulbo branco com dentes rosados
855	<i>A. sativum</i>	2000	Salto Veloso-SC	10 anos	Folha larga, bulbo bege com dentes rosados
856	<i>A. sativum</i>	2000	Salto Veloso-SC	20 anos	Folha verde escura e bulbo bege com dentes roxos
857	<i>A. sativum</i>	2000	Rio do campo-SC	5 anos	Folha estreita, bulbo bege com dentes rosados
858	<i>A. sativum</i>	2000	Rio do campo-SC	5 anos	Folha estreita, bulbo bege com dentes brancos
859	<i>A. sativum</i>	2000	Rio das Antas-SC	35 anos	Folha estreita, bulbo branco com dentes rosados
865	<i>A. sativum</i>	2000	Rio das Antas-SC	35 anos	Folha estreita, bulbo branco com dentes rosados
866	<i>A. sativum</i>	2000	Ibicaré-SC	7 anos	Folha estreita, bulbo bege com dentes rosados
870	<i>A. sativum</i>	2000	Ibicaré-SC	7 anos	Folha estreita, bulbo bege com dentes rosados
871	<i>A. sativum</i>	2000	Joaçaba-SC	14 anos	Folha larga, bulbo bege com dentes rosados
872	<i>A. sativum</i>	2001	Caçador-SC	35 anos	Folha verde escura, bulbo roxo e dentes arroxeados
873	<i>A. sativum</i>	2001	Caçador-SC	35 anos	Folha larga, bulbo bege com dentes rosados
874	<i>A. sativum</i>	2001	Calmon-SC	40 anos	Folha verde e ereta, bulbo bege e dentes arroxeados
875	<i>A. sativum</i>	2001	Calmon-SC	40 anos	Folha verde escura, bulbo bege e dentes arroxeados

Anexo 2. Identificação, ano de introdução, origem, tempo de cultivo e características gerais das variedades cultivadas de alho do Banco Ativo de Germoplasma de Santa Catarina (Florianópolis-SC, Epagri/CCA/UFSC, 2003).

Identificação	espécie	Ano de Introdução	Procedência (País)	Tempo de cultivo em Santa Catarina	Características gerais da planta
Cará	<i>A. sativum</i>	1980	Brasil-SC	20 anos	Folhas estreitas e eretas, bulbo chato e branco
Gigante	<i>A. sativum</i>	1980	Brasil-SC	20 anos	Folha estreita, bulbos e dentes arroxeados
Fuego/INTA	<i>A. sativum</i>	1995	Argentina	8 anos	Planta alta, bulbos brancos com dentes roxos
Jonas	<i>A. sativum</i>	1990	Brasil-SC	10 anos	Folha estreita, bulbos médios com dentes roxos
Caçador-30	<i>A. sativum</i>	1990	Brasil-SC	12 anos	Folha estreita, bulbos médios com dentes roxos
Caçador-40	<i>A. sativum</i>	1994	Brasil-SC	10 anos	Folha estreita, bulbos médios com dentes roxos
Quitéria	<i>A. sativum</i>	1980	Brasil-RS	20 anos	Folha estreita, bulbos médios com dentes roxos
Chonan	<i>A. sativum</i>	1975	Brasil-SC	30 anos	Folha larga, bulbos médios com dentes roxos
Roxo Caxiense	<i>A. sativum</i>	1990	Brasil-RS	10 anos	Folha larga, bulbo grande com dentes roxos
Contestado	<i>A. sativum</i>	1980	Brasil-SC	20 anos	Folhas largas, bulbo médio e dente roxo intenso
Chinês/Arg.	<i>A. sativum</i>	2002	China	-	Folha larga, bulbo médio com dentes brancos
Chinês/Ch.	<i>A. sativum</i>	2002	China	-	Folha larga, bulbo médio com dentes brancos
Soft Steim	<i>A. sativum</i>	2000	China	-	Folha larga, bulbo pequeno com dentes rosados
Hard Steim	<i>A. sativum</i>	2000	China	-	Folha larga bulbo pequeno com dentes rosados
Chinesão	<i>A. sativum</i>	1985	China	-	Folhs largas, bulbo grande com dentes brancos
Russo	<i>A. sativum</i>	1990	Russia	-	Folha estreita, bulbo médiocom dentes rosados
Mexicano	<i>A. sativum</i>	1990	México	-	Folha estreita, bulbo médiocom dentes rosados
Blanco	<i>A. sativum</i>	1985	Argentina	-	Planta alta, bulbo e dentes brancos
Colorado	<i>A. sativum</i>	1985	Argentina	15 anos	Planta alta, bulbo branco com dentes roxos
Alho Rei	<i>A. ampeloprasum</i>	1980	Brasil-SC	-	Folhas muito largas, bulbo com dentes grandes

Anexo 3. Descritores morfológicos utilizados na caracterizações dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma de alho de Santa Catarina, por análise multivariada. Epagri/UFSC, Florianópolis-SC, 2003.

Acessos	APL	CFO	LFO	NFO	AFO	PBU	NDB	FTB	PDB	FDB	CTB	CTD	HFL	PBA	DFO	ARQ
744	59,5	46,5	26,3	7,5	24,0	25,7	24,8	3	2	1	3	2	1	1	1	1
747	65,0	50,5	28,0	8,2	26,0	30,7	26,2	3	2	1	3	2	1	1	1	1
748	62,7	49,7	25,5	8,0	28,2	27,3	23,5	2	2	1	3	2	1	1	1	1
750	79,5	62,5	33,5	8,0	28,8	42,3	12,7	1	2	2	3	1	1	1	1	2
751	32,0	25,2	18,0	5,7	24,2	32,5	12,2	1	2	2	3	1	1	1	1	1
756	69,8	53,7	35,3	8,0	28,3	33,9	23,3	2	2	1	3	2	1	1	1	1
761	72,2	54,3	30,0	8,8	20,0	30,1	22,7	2	2	1	3	2	1	1	1	1
766	67,7	52,3	28,3	7,8	22,5	44,7	22,5	1	2	1	3	1	1	1	1	2
767	75,3	54,0	29,8	8,5	28,3	32,3	12,5	1	2	1	3	1	1	1	1	2
770	77,2	55,5	29,7	8,5	28,3	28,6	24,3	2	2	1	3	2	1	1	1	1
768	62,0	44,7	25,0	8,2	21,3	40,0	17,3	1	2	1	3	1	1	1	1	1
773	67,2	50,5	28,5	8,2	30,8	41,3	22,0	3	2	1	3	1	1	1	1	1
774	71,2	52,5	27,2	7,7	26,2	41,9	23,8	3	2	1	3	2	1	1	1	1
776	73,3	53,5	26,5	8,2	27,5	32,2	16,5	3	2	1	3	2	1	1	1	1
777	72,5	55,0	28,3	8,0	29,3	32,0	22,2	3	2	1	3	2	1	1	1	1
778	73,7	51,8	25,5	8,3	29,2	34,8	22,2	3	2	1	3	2	1	1	1	1
780	69,3	49,2	26,5	7,7	32,5	42,7	25,7	3	2	1	3	2	1	1	1	1
782	62,2	47,0	24,3	7,5	24,3	30,2	26,5	2	2	1	3	2	1	1	1	1
783	68,3	49,5	26,3	7,8	28,3	42,2	28,0	3	2	1	3	2	1	1	1	1
787	70,0	49,8	25,0	8,5	29,2	30,7	24,7	2	2	1	3	2	1	1	1	1
788	84,3	63,5	32,7	8,0	37,2	41,3	13,7	2	2	1	3	2	1	1	1	1
789	78,3	58,5	29,7	7,7	36,7	40,8	13,2	3	2	1	3	2	1	1	1	1
790	75,5	53,3	26,8	7,5	29,5	32,4	20,5	3	2	1	3	2	1	1	1	1
791	76,0	54,3	27,2	7,7	24,3	34,6	23,8	3	2	1	3	2	1	1	1	1
798	104,0	75,2	28,2	7,3	29,3	33,6	12,2	2	3	1	2	2	1	1	2	3
799	99,8	76,2	29,2	7,3	30,3	20,6	7,3	2	3	1	2	2	1	1	2	3
800	97,8	73,2	28,2	7,3	30,0	20,8	7,5	2	3	1	2	2	1	1	2	3
801	70,2	49,3	27,5	8,0	26,7	36,0	25,7	3	2	1	3	2	1	1	1	1
802	71,3	52,5	27,3	8,3	23,7	41,7	13,0	3	2	1	3	2	1	1	1	1
807	71,0	51,5	27,3	8,7	26,7	34,8	13,3	3	2	1	3	2	1	1	1	1
808	68,7	50,3	25,7	7,8	26,5	40,3	28,0	3	2	1	3	2	1	1	1	1
809	67,5	51,2	25,7	7,8	29,2	36,4	26,8	3	2	1	3	2	1	1	1	1
813	70,8	69,8	24,7	8,3	27,7	29,8	24,7	3	2	1	3	2	1	1	1	1
814	75,2	58,3	32,2	8,2	29,0	33,1	15,5	1	2	2	3	2	1	1	1	1
815	90,2	67,0	36,8	8,3	28,0	52,2	17,0	1	2	1	3	1	1	1	1	2
816	76,2	55,5	28,2	8,0	28,0	42,7	17,0	1	2	1	3	1	1	1	1	1

continuação

819	71,3	56,3	31,0	8,3	23,0	31,6	26,8	3	2	1	3	2	1	1	1	1
821	69,2	50,2	26,8	8,0	24,2	36,6	24,0	3	2	1	3	2	1	1	1	1
822	69,8	54,2	25,8	8,3	25,0	41,8	24,8	3	2	1	3	2	1	1	1	1
823	68,3	51,8	29,7	7,5	26,2	41,9	13,8	3	2	1	3	2	1	1	1	1
824	70,0	53,7	25,0	7,8	23,3	32,9	23,8	3	2	1	3	2	1	1	1	1
825	79,8	61,2	30,0	8,0	21,5	51,1	17,8	1	2	1	3	1	1	1	1	2
826	69,2	50,7	26,8	8,0	22,8	23,8	12,7	3	2	1	3	2	1	1	1	1
827	66,5	48,0	24,5	7,7	26,7	22,0	12,7	3	2	1	3	2	1	1	1	1
828	72,8	49,8	27,7	8,2	25,0	36,4	13,2	3	2	1	3	2	1	1	1	1
830	74,7	53,7	25,2	7,5	23,3	44,0	12,2	3	2	1	3	2	1	1	1	1
831	78,3	54,5	28,2	8,2	23,0	32,8	13,2	3	2	1	3	2	1	1	1	1
832	73,7	50,5	23,8	7,7	24,3	30,3	22,8	3	2	1	3	2	1	1	1	1
833	74,2	53,8	26,2	8,3	25,8	50,5	22,5	3	2	1	3	2	1	1	1	1
834	71,3	53,0	24,3	7,3	22,5	52,6	23,8	3	2	1	3	2	1	1	1	1
835	72,7	55,7	27,0	7,3	27,5	41,7	16,8	3	2	1	3	2	1	1	1	2
836	67,7	47,3	24,3	7,5	30,3	32,9	22,8	3	2	1	3	2	1	1	1	1
840	97,2	71,5	27,7	8,0	29,5	28,8	7,7	3	3	1	2	2	1	1	2	3
841	96,0	73,8	29,2	7,8	30,7	29,8	12,8	2	3	1	3	2	1	1	2	3
842	93,8	68,0	29,0	7,3	29,8	20,9	12,5	2	3	1	2	2	1	1	2	3
845	102,0	70,5	25,7	7,8	28,3	52,0	12,0	2	3	1	2	2	1	1	2	3
846	105,8	76,5	26,8	7,8	35,7	44,3	7,5	2	3	1	2	2	1	1	2	3
847	105,2	73,0	27,8	7,7	30,3	41,1	7,0	2	3	1	3	2	1	1	2	3
848	101,3	73,0	30,5	7,5	38,5	59,5	11,2	2	3	1	3	2	1	1	2	3
850	80,7	59,2	29,2	8,3	22,5	45,7	11,7	2	2	1	3	1	1	1	1	1
851	79,3	59,5	28,2	8,0	23,2	50,7	11,3	2	2	1	3	1	1	1	1	1
852	82,8	59,5	30,8	8,0	31,5	41,8	12,7	3	2	1	3	2	1	1	1	1
854	82,0	60,3	29,2	7,7	30,2	41,0	12,0	3	2	1	3	2	1	1	1	1
855	79,7	55,5	29,0	8,5	28,7	36,5	12,7	3	3	1	3	2	1	1	1	1
856	79,8	54,3	26,2	8,3	23,8	41,4	13,0	3	2	1	3	2	1	1	1	1
857	77,8	56,7	28,3	8,5	26,7	37,4	12,7	3	3	1	3	2	1	1	1	1
858	76,8	55,3	27,0	8,3	30,0	30,3	22,5	3	2	1	2	2	1	1	1	1
859	80,3	59,3	27,5	8,2	30,8	36,1	12,3	3	2	1	3	2	1	1	1	1
865	79,7	60,5	30,2	8,0	29,2	41,9	12,2	3	2	1	2	2	1	1	1	1
866	76,3	54,3	24,8	7,8	27,5	35,5	17,2	3	2	1	2	2	1	1	1	1
870	79,2	59,0	29,3	8,5	29,2	42,2	12,7	3	2	1	2	2	1	1	1	1
871	71,7	51,8	27,5	8,0	28,5	30,3	12,5	3	2	1	3	2	1	1	1	1
872	64,3	48,3	25,5	7,5	27,5	31,5	23,8	2	2	1	3	1	1	1	1	2
873	73,8	51,8	24,3	7,8	27,0	34,7	22,8	3	2	1	3	2	1	1	1	1
874	77,8	56,5	30,7	8,7	27,5	50,3	12,0	2	2	1	3	1	1	1	1	2
875	73,5	52,3	24,5	7,5	28,3	35,3	23,2	2	3	1	3	1	1	1	1	2
Cará	76,8	51,3	24,8	8,5	36,0	35,5	17,7	1	3	1	2	1	1	1	1	1

continuação

Gigante	79,8	60,7	30,5	8,0	29,2	48,1	16,0	2	2	1	3	3	1	1	1	2
Fuego-INTA	88,7	65,5	30,0	7,8	42,8	32,2	16,0	2	1	3	1	3	3	2	1	2
Jonas	77,0	58,8	30,8	7,8	30,2	33,2	13,5	2	1	2	2	3	3	2	1	2
Caçador-40	75,8	58,5	26,7	7,8	28,2	27,8	13,5	2	1	3	2	3	3	2	1	2
Quitéra	74,2	56,2	28,7	7,8	27,5	32,3	12,8	2	1	2	2	3	3	2	1	2
Chonan	83,2	57,2	28,8	8,0	27,2	23,7	13,5	2	2	2	2	3	3	2	1	2
R. Caxiense	69,5	57,2	28,2	7,8	28,3	23,4	15,7	2	3	3	2	3	3	2	1	2
Caçador-30	69,2	57,5	26,0	7,7	33,3	23,5	13,5	2	2	3	2	3	3	2	1	2
Contestado	72,8	55,0	26,3	7,5	32,0	30,4	12,3	2	2	3	2	3	2	2	1	2
Chin/Arg	63,3	55,7	25,2	6,8	40,5	31,6	12,0	3	2	2	2	2	1	1	2	3
Chin/Chi	63,0	58,0	23,7	7,2	41,8	32,0	13,0	3	2	2	2	2	1	1	2	3
Soft Steim	52,7	47,5	23,8	8,0	44,5	30,8	11,5	2	2	2	1	1	1	1	1	3
Hard Steim	51,8	47,0	22,0	7,8	45,2	29,8	11,5	2	2	2	1	1	1	1	1	3
Chinesão	73,2	61,5	28,0	8,3	42,8	40,3	15,5	1	2	1	1	1	1	1	2	2
Russo	61,3	49,8	24,0	7,7	34,5	33,2	11,2	2	2	2	1	1	1	1	1	3
Mexicano	73,0	64,2	27,3	8,2	32,8	33,5	13,0	2	2	2	2	1	1	1	1	2
Blanco	78,8	54,5	27,0	7,2	33,2	35,9	13,2	2	2	2	1	1	1	1	2	2
Colorado	75,7	48,8	28,8	7,7	33,8	40,1	13,3	2	2	2	2	1	1	1	1	2
Rei	86,8	67,0	33,4	6,2	44,2	65,0	3,2	3	3	2	1	1	4	1	2	3

- 1) Altura da planta (APL)
- 2) Comprimento da 4. folha (CFO)
- 3) Largura da 4. folha (LFO)
- 4) Número de folhas verdes (NFO)
- 5) Ângulo da folha com o pseudo-caule (AFO)
- 6) Peso do bulbo (PBU)
- 7) Número de dentes por bulbo (NDB)
- 8) Formato transversal do bulbo (FTB): Classificados com notas de 1 a 3 (1= chato; 2= codiforme; 3= circular)
- 9) Posição do disco basal (PDB): Classificados com notas de 1 a 3 (1= proeminente; 2= fundido; 3= em nível)
- 10) Forma de distribuição dos bulbilhos no bulbo (FDB): notas de 1 a 3 (1= regular MC; 2= regular DE; 3=regular RD)
- 11) Cor da túnica do bulbo (CTB): Classificados com notas de 1 a 3 (1= branca; 2= pérola; 3= branca arroxeadada)
- 12) Cor da túnica do dente (CTD): Classificados com notas de 1 a 3 (1= branca; 2= rosada; 3= arroxeadada)
- 13) Formação de hastes florais (HF) - notas de 1 a 4: 1) ausência; 2) baixa; 3) média; 4) alta (avaliação na colheita)
- 14) Bulbilhos aéreos (PBA): Classificados com notas de 1 a 2 (1= ausente; 2= presente) (avaliação na colheita)
- 15) Densidade foliar (DFO): Classificados com notas de 1 a 3, conforme gabarito:
 - 1) baixa, 2) média, 3) alta;
- 16) Arquitetura da planta (ARQ): Classificados com notas de 1 a 3 (1= ereta; 2= semi-ereta; 3= decumbentes)

Anexo 4. Constituição genotípica de 9 locos isoenzimáticos de 20 acessos de *Allium sativum* L (CCA/UFSC, Florianópolis-SC, 2003).

Acessos	Genótipos						
	ACP	ADH	G2DH	G6MDH	MDH	PGI-1	PGI-2
1	22	11	22	11	11	22	11
2	11	11	22	11	11	23	11
3	12	11	22	11	11	22	11
4	22	11	11	11	11	22	11
5	22	11	11	11	11	22	11
6	22	22	22	12	12	22	11
7	22	22	22	11	11	11	11
8	22	11	22	11	11	12	11
9	22	11	22	11	12	22	11
10	22	11	22	11	11	22	11
11	22	11	22	11	11	22	11
12	22	11	22	11	11	11	11
13	12	11	22	11	11	12	11
14	22	11	11	11	22	22	11
15	22	12	11	11	11	22	11
16	11	11	11	11	11	22	11
17	11	11	11	11	11	11	11
18	11	12	22	11	11	12	11
19	22	11	22	12	11	11	11
20	22	11	33	11	23	23	11

Anexo 5. Frequências alélicas para os 9 locos alozimicos em 20 acessos de *Allium sativum* L. (UFSC, Florianópolis-SC, 2003).

LOCO	ALEL O	Acessos 1 a 10									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ACP-1	1	0,500	1,000	0	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000
	2	0,500	0	1,000	0	0	0	0	1,000	0	0
ACP-2	1	1,000	1,000	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
ACP-3	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ADH	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,500	0,500	1,000	1,000	0,500
	2	0	0	0	0	0	0,500	0,500	0	0	0,500
G2DH	1	0	0	0	1,000	0	0	0	0	0	0
	2	1,000	1,000	1,000	0	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G6PDH	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,500	0,500	0,500	1,000	0,500
	2	0	0	0	0	0	0,500	0,500	0,500	0	0
MDH	1	1,000	0,500	0,500	1,000	1,000	0,500	1,000	1,000	0,500	1,000
	2	0	0,500	0	0	0	0,500	0	0	0,500	0
PGI-1	1	1,000	1,000	0,500	1,000	1,000	0,500	1,000	1,000	1,000	1,000
	2	0	0	0,500	0	0	0,500	0	0	0	0
PGI-2	1	0,500	0	0	0	0	0	0	0,500	0	0
	2	0,500	0,500	0,500	1,000	1,000	1,000	1,000	0,500	0,500	1,000
	3	0		0,500	0	0	0	0	0	0,500	0

Continuação

LOCO	ALEL O	Acessos 11 a 20									
		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ACP-1	1	1,000	1,000	0,500	0,500	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	2	0	0	0,500	0,500	0	0	0	0	0	0
ACP-2	1	0,500	0,500	0	0	0	1,000	1,000	0	0	0,500
	2	0,500	0,500	1,000	1,000	1,000	0	0	1,000	1,000	0,500
ACP-3	1	0,500	0,500	1,000	1,000	0,500	1,000	1,000	1,000	1,000	0
	2	0,500	0,500	0	0	0,500	0	0	0	0	0,500
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,500
ADH	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,500
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,500
G2DH	1	1,000	1,000	0	0	0	1,000	1,000	0	0	0
	2	0	0	1,000	1,000	1,000	0	0	0	1,000	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	1,00	0	1,000
G6PDH	1	1,000	1,000	0,500	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	2	0	0	0,500	0	0	0	0	0	0	0
MDH	1	1,000	1,000	1,000	0,500	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,500
	2	0	0	0	0,500	0	0	0	0	0	0,500
PGI-1	1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PGI-2	1	0	0	0	0,500	0	0	1,000	0	0,500	0,500
	2	1,000	1,000	1,000	0,500	1,000	0,500	0	1,000	0,500	0,500
	3	0	0	0	0	0	0,500	0	0	0	0