

Padrões genotípicos de cultivares de alho (*Allium sativum* L.) do Planalto Catarinense caracterizadas por marcadores microssatélites

Gabriela Andreatta Matias¹, Dalvan Beise², Valdir Marcos Stefenon³

¹ Acadêmica do Curso de Agronomia, UFSC, *campus* Florianópolis, Centro de Ciências Agrárias, e-mail: gabrielaandreatta14@gmail.com

² Biólogo, M.Sc, UFSC *campus* Florianópolis, Departamento de Fitotecnia, CCA, e-mail: dalvanbio@gmail.com

³ Biólogo, Dr., UFSC, *campus* Florianópolis, Departamento de Fitotecnia, CCA, e-mail: valdir.stefenon@ufsc.br

Resumo - O alho é uma cultura amplamente consumida em todo o mundo e corresponde a parte importante da economia e da alimentação no Brasil. A produção dessa cultura é uma alternativa de renda interessante para agricultores familiares, pois apresenta um rendimento considerável em áreas pequenas, ainda que exija muitos cuidados no manejo. O Planalto Catarinense é uma região importante na produção de alho e torna o estado de Santa Catarina o 3º maior produtor do Brasil, competindo diretamente com o alho argentino no mercado nacional. Devido a seu tipo de propagação assexuada, estudo em nível molecular da cultura, se faz interessante para compreender a frequência de mutações que permitem a seleção e otimização da produção, além da valorização do produto de agricultores locais. Foram utilizados 12 marcadores moleculares SSR para a análise da diferença genética de 8 cultivares coletadas no Planalto Catarinense e estimado sua diversidade genética por meio de diferentes índices de diversidade, como número total de alelos, número efetivo de alelos, índice de Shannon, heterozigosidade esperada, heterozigosidade observada, análise da variância molecular, distância genética de Nei e análise de coordenadas principais. Os resultados finais são referentes a somente 4 marcadores e mostraram diferença genética entre cultivares, no entanto, para maior qualidade nos resultados obtidos, são necessárias análises complementares com maior número de marcadores moleculares.

Termo para indexação: marcadores SSR; padrões alélicos; diversidade genética; sequenciamento genético

Genotypic patterns of garlic (*Allium sativum* L.) cultivars from Planalto Catarinense characterized by microsatellite markers

Abstract - The garlic is a widely consumed crop around the world and corresponds to an important part of the Brazilian economy and feeding. This crop production is an interesting income alternative for family farmers, because garlic has considerable yield in small areas, even though it needs special handling. The Planalto Catarinense is an important region for the garlic production and it makes Santa Catarina the 3rd largest producer in Brazil, competing directly with Argentinian garlic. Due to its asexual propagation type, studies at molecular level are interesting to understand the frequency of mutations that allows the selection and optimization of the production, in addition valorization of the product of local farmers. Twelve SSR molecular markers were used for the analysis of 8 cultivars collected in Planalto Catarinense and estimated genetic diversity from indexes for total allele numbers, effective allele numbers, Shannon index, expected heterozygosity, observed heterozygosity, molecular variance analysis, Nei's standard genetic distance and Principal Coordinates Analysis. The final results are from only 4 markers and they showed genetic differences between cultivars, however for better results in this research, it is necessary to make a complementary analysis with a bigger number of molecular markers.

Index terms: SSR markers; allelic patterns; genetic diversity; genetic sequencing

Introdução

O alho (*Allium sativum* L.), pertencente à família Amaryllidaceae, é uma cultura olerícola amplamente consumida por diversos povos e etnias, para diversas finalidades, mas principalmente como condimento na culinária, devido ao seu aroma típico. Também há aplicação do alho com propósitos terapêuticos e medicinais (KIK et al., 2001).

É sabido que o centro de origem do alho é a Ásia Central, sendo uma espécie característica de regiões de clima temperado (CUNHA et al., 2012) e que sua introdução no Brasil foi feita junto à colonização portuguesa, quando acabou

ocupando parte importante da economia rural, sendo cultivado por agricultores de pequenas, médias e grandes produções (RESENDE, 2018).

Hoje, a China é o maior produtor mundial de alho. O Brasil ocupa a 13ª posição mundial de produção da cultura e a 2ª posição da América Latina, ficando atrás somente da Argentina (NICK & BORÉM, 2017). A maior parte do alho consumido no Brasil é importada de países como China, Argentina e Espanha e enquanto a produção nacional abastece cerca de 45% do consumo interno de alho (RESENDE et al., 2018).

Segundo IBGE (2017), os principais estados produtores de alho correspondem à Minas Gerais (41,577 t), Goiás (25,662 t), Santa Catarina (16,272 t) e Rio Grande do Sul (10,227 t), sendo a produtividade média dos estados do Centro-Oeste de 12 a 16 toneladas por hectare, e os estados do Sul, cerca de 9 toneladas por hectare (IBGE, 2020). Em Santa Catarina, a produção de alho se concentra em alguns municípios do oeste do estado, principalmente na região do Planalto. No mercado, o alho produzido na região Sul do Brasil compete diretamente com o alho produzido na Argentina, já que o cultivo e colheita das safras se dão em períodos próximos, o que implica na entrada simultânea dos alhos no setor nacional.

Embora o consumo de alho no mercado brasileiro ainda dependa de importações, sua produção exerce grande importância econômica para pequenos agricultores familiares, pois é uma cultura que, apesar da demanda de cuidados e mão de obra, tem alto rendimento em áreas pequenas, e serve como garantia de renda para os agricultores familiares (RESENDE, 2018).

O alho produzido no Brasil, se diferencia em dois tipos, o alho dito “nobre”, o qual corresponde aos alhos destinados ao mercado formal, que atendem às características de uniformidade, tamanho ideal de bulbos e menor número de bulbilhos por bulbo (Figura 1). São produzidos por grandes produtores e têm alto valor agregado. Já o alho “seminobre”, possui menor tamanho de bulbos, por vezes, produz bulbilhos pequenos e estreitos. Este tipo de alho é geralmente destinado aos mercados locais e feiras (NICK & BORÉM, 2017).



Figura 1. Bulbos e bulbilhos de dois indivíduos de alho nobre, cultivar Contestado.
Fonte: Prof. Dr. Leocir José Welter, UFSC Curitibanos.

Para que a produção desses tipos de alho seja efetiva no Brasil, alguns fatores são importantes, entre eles, deve-se considerar que a temperatura da região onde é produzido o alho, como fator fundamental no desenvolvimento da cultura, uma vez que seu centro de origem é uma região de clima temperado, o crescimento dos alhos depende de temperaturas médias entre 10°C a 25°C durante seu ciclo de vida. O fotoperíodo também deve ser considerado no cultivo das variedades de alho, já que é um fator determinante na produção de bulbos e bulbilhos (LANDAU et al., 2020).

Para superar as limitações relacionadas à temperatura e fotoperíodo, a vernalização é uma alternativa interessante, que auxilia na indução da floração, servindo como forma de uniformizar o plantio em períodos de invernos com temperaturas mais altas (LOPES et al., 2016 & LUCINI, 2004). O plantio do alho na região do Planalto de Santa Catarina é feito, majoritariamente, no período entre maio e agosto, nos períodos de outono e inverno da região.

Além das questões de manejo, clima e solo, a forma de propagação da cultura também é um fator de grande relevância. O alho é uma espécie diplóide e sua principal forma de propagação é por meio de reprodução assexuada por apomixia, através do plantio dos bulbilhos (CUNHA et al., 2012). Devido às condições de propagação do alho, para que haja variabilidade genética entre as

cultivares de alho, deve ocorrer mutações genéticas, pressão do ambiente ou ação de agentes mutagênicos externos como os agrotóxicos.

A discriminação de cultivares de alho pode ser fundada em características fenotípicas, porém sabe-se que sua morfologia pode variar significativamente dentro da mesma cultivar sob diferentes condições de clima, solo e manejos (MA et al., 2009; BRADLEY et al., 1996). Assim, as variedades que se diferenciam por características de interesse agrônomo e comercial, são selecionadas a partir de indivíduos que apresentam bases genéticas que configuram essas características (VOLK et al., 2015; LAMPASONA et al., 2003).

Para a caracterização de cultivares de interesse agrônomo, é necessário a utilização de ferramentas biotecnológicas que permitam a obtenção de informações confiáveis. Nisso, os marcadores microssatélites ou marcadores *Single Sequence Repeat* (SSR) são formados por curtas sequências de nucleotídeos, cerca de 1 a 6 bases espalhadas pelo genoma (MA et al., 2009) e são considerados ferramentas importantes em análises de diversidade genética e genética de populações em diversas espécies (AGRAMA et al., 2007). O uso desses marcadores é uma escolha interessante para estudos de laboratório, devido ao seu alto grau de polimorfismo, codominância e potencial detecção da variabilidade genética, além da facilidade e efetividade em estudos de laboratório (CUNHA et al., 2012).

O presente trabalho propõe caracterizar e comparar os padrões alélicos e genotípicos das diferentes cultivares e estimar índices de diversidade genética para as populações estudadas, utilizando de marcadores moleculares SSR.

Metodologia

O material vegetal utilizado foi coletado logo após a colheita em lavouras de produtores da região do Planalto de Santa Catarina durante o período de 22 a 26 de novembro de 2021. Oito cultivares foram selecionadas e separadas para o estudo: Esmeralda (esme), Quitérias (quit), Contestado (cont), Chonan (chon), Fuego-INTA (fueg), Roxo Caxiense (roxo) e duas populações distintas da cultivar Ito, sendo uma população composta por genótipos superiores para características morfológicas de interesse comercial (ito+) e outra composta por genótipos inferiores para as mesmas características (ito-). Das oito cultivares, seis são tipicamente dita oriundas da região

do Planalto Catarinense (Esmeralda, Quitéria, Contestado, Chonan, Ito superior e Ito inferior) e duas (Fuego-INTA e Roxo Caxiense) são cultivares de origem argentina e de Caxias do Sul, do estado do Rio Grande do Sul, respectivamente. Os alhos estudados aqui, são considerados alhos do tipo nobre.

Após a coleta, o material foi destinado ao Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), *campus* Florianópolis, em Santa Catarina, onde foi feita a extração do DNA e outras análises.

A extração do material genético foi feita diretamente dos bulbilhos das plantas, utilizando-se cerca de 100 mg de tecido vegetal de cada indivíduo, com base no protocolo CTAB (DOYLE & DOYLE, 1990) e o seguimento do trabalho se deu após a aferição de qualidade e quantidade do DNA extraído desses materiais através do sistema de espectrofotometria modelo NanoDrop® e por eletroforese em gel agarose a 1%. As amostras foram armazenadas em freezer até as próximas etapas de trabalho.

Foram selecionados doze marcadores SSR (tabela 1), reportados anteriormente na literatura por Cunha et al., (2012) e Ma et al., (2009). Foram selecionados os marcadores mais polimórficos dentre outros e previamente testados em laboratórios.

Os primers forward dos marcadores microssatélites foram marcados com corantes fluorescentes FAM™ ou HEX™, e amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR) em aparelho termociclador e utilizando a metodologia de cauda M-13 (SCHUELKE, 2000).

A partir da metodologia adaptada de Shuelke (2000), modificações foram aplicadas no mix para PCR [5,38 µL H₂O; 0,25 µM de buffer de PCR, 0,5 µM de MgCl₂, 1 U de Taq DNA-Polimerase, 0,05 µM de cada dNTP, 0,125 µM de primer *Forward*, 0,125 µM de primer *Reverse* e 0,01% de BSA]. Para cada tubo de PCR, foi adicionado 13 µL de mix para 2 µL de DNA para cada amostra. O ciclo de amplificação foi de 3 minutos a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 40 segundos a 94 °C, 45 segundos a 56 °C e 45 segundos a 72 °C, e oito ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 53 °C e 45 segundos a 72 °C. A última etapa foi finalizada com

extensão de 10 minutos a 72°C. Para a metodologia aplicada, no primer *Forward* no sentido 3', houve uma elongação de 18 bases com a sequência de M-13 (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') e utilizou-se um terceiro primer com marcação fluorescente (5'- FAM ou HEX^TTGTAACGACGGCCAGT-3').

Tabela 1. Marcadores SSR selecionados, relacionados às suas respectivas sequências de iniciadores, sendo F para *Forward* e R para *Reverse*.

Locus	Sequência dos iniciadores (5' - 3')	Motivo de repetição	Referência
Asa08	F: TGATTGAAACGAATCCCACA R: GGGGTTACCTGAACCTGTTA	(GT) ₈	Cunha et al. (2012)
Asa16	F: CACGACTTTTCCTCCCATT R: CTAATGTTTCATGTCCCCAGT	(TG) ₅ C(GT) ₊	Cunha et al. (2012)
Asa17	F: TCCACGACACACACACACAC R: ATGCAGAGAATTTGGCATCC	(CA) ₁₂ (CT) ₂₈	Cunha et al. (2012)
Asa24	F: TTGTTGTGCCGAGTTCCATA R: AGCAATTTACCAAAGCCAAG	GT ₄ (GT) ₊ , (GT) ₅	Cunha et al. (2012)
Asa25	F: GCACTTCACTTTCCCCATTC R: GGCGACGGTGAAGAGAGAG	(CT) ₃ (CT) ₂₇	Cunha et al. (2012)
Asa31	F: CAGAGACTAGGGCGAATGG R: ATGATGATGACGACGACGAG	(CTT) ₇	Cunha et al. (2012)
GB-ASM-040	F: CACAGCAACATGCACCAT R: TGCCGGAACCTCGATATT	(AC) ₆ (AC) ₁₄ (AT) ₊	Ma et al. (2009)
GB-ASM-053	F: ACAAGGTGACATCGTTTG R: GGGCTTCACCTGAACACA	(CA) ₁₅ (AC) ₈	Ma et al. (2009)
GB-ASM-059	F: CACAGCAACATGCACCAT R: TGCAAAGCAATATGGCAG	(TG) ₁₁ (TG) ₅	Ma et al. (2009)
GB-ASM-072	F: CACGCGAATCTTTCTTGG R: TGCAAAGCAATATGGCAG	TA ₇ (TG) ₅ GC(GT) ₉ T(TG) ₈	Ma et al. (2009)
GB-ASM-078	F: TGTTCCAACCAGATTTAATGC R: AAGTGGCGGTTGTGTCTG	(GT) ₁₂	Ma et al. (2009)
GB-ASM-080	F: AATCTCCCTCCAAAGTCCC R: CCTGTATTTTGTGTAAAGCATCA	(CCG) ₅	Ma et al. (2009)

Após a etapa de amplificação, para a confirmação das reações de PCR, os alelos foram separados via eletroforese em gel de agarose a 2%. Foi aplicado o corante Gelred® (Biotium) no produto de cada amostra da PCR, e a avaliação foi feita a partir da visualização destes alelos corados em um transiluminador de luz UV-Vis.

Foi feita uma diluição de cada amostra após a PCR em água ultra-pura na proporção de 1:10, com volume final de 10µL. Depois foi feita a preparação das placas compatíveis com o sequenciador com a mistura (7 µL) de formamida com lis para cada 3 µL de DNA, sendo cada 1 µL desses, referentes às mesmas amostras de cultivares, mas de primers diferentes, como forma de otimizar o processo.

A identificação dos alelos amplificados foi feita em equipamento de eletroforese capilar, da marca ABI 3500xL® Genetic Analyser. A identificação dos tamanhos de alelos de seus respectivos locus foram identificados com a utilização do software GeneMapper™ e por avaliação manual.

Para cada cultivar, foram estimados os seguintes índices de diversidade genética: número total de alelos (A), número efetivo de alelos (Ae), índice de Shannon (I), heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho) e coeficiente de endogamia (F). Para diferenciação entre grupos utilizou-se a distância genética de Nei e análise da variância molecular hierarquizada (AMOVA). Para a representação gráfica da distância genética entre os pares de amostras, foi utilizada a análise de coordenadas principais (PCoA). Todos os dados estimados, foram gerados pela utilização da plataforma *Genetic Analysis in Excel* (GenAIEx).

Resultados e discussão

Apesar de todos os marcadores utilizados apresentarem produtos de PCR visíveis após a eletroforese em agarose, foram obtidos dados somente para quatro marcadores moleculares na eletroforese capilar, devido a problemas técnicos no equipamento.

Os resultados da análise de índices de diversidade genética (Tabela 2) mostram número médio de alelos das cultivares estudadas, cujo a cultivar Chonan apresentou o maior valor em relação às demais cultivares (2,0), enquanto Fuego-INTA, Contestado e Quitéria apresentam a mesma quantidade de números

médios de alelos (1,75). Enquanto Esmeralda e Ito- apresentam valor de 1,50 e Roxo Caxiense apresenta menor número médio de alelos (1,25).

Tabela 2. Padrões alélicos médios para cultivares.

	Ito+	Esme	Ito-	Quit	Cont	Fueg	Roxo	Chon
A	1,750	1,500	1,500	1,750	1,750	1,750	1,250	2,000
Ae	1,750	1,500	1,500	1,750	1,736	1,750	1,250	1,775
I	0,520	0,520	0,520	0,520	0,516	0,520	0,347	0,576
Nº alelos privados	0,250	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,750
He	0,400	0,400	0,400	0,401	0,399	0,400	0,267	0,430

A = número de alelos; Ae = número efetivo de alelos; I = índice de Shannon; He = heterozigiosidade esperada por cultivares. Números destacados em ciano representam os maiores valores, e os números destacados em vermelho representam os menores valores. Números destacados em amarelo se referem aos valores para nº de alelos privados somente para duas cultivares.

Para os índices de número de alelos, número efetivo de alelos, índice de Shannon e heterozigiosidade esperada, há um padrão nos resultados obtidos. Os maiores valores para esses índices são referentes à cultivar Chonan, enquanto o menos valores para os mesmo índices, são referentes à cultivar Roxo Caxiense. Para o índice de número de alelos privados (Tabela 3), somente as cultivares Chonan (0,75) e Ito+ (0,25) apresentaram estimativas. Isso indica para estas cultivares, a ausência do fluxo gênico, o que permite discriminar essas populações. Esse resultado é compatível com a tabela 4 e figura 3, a qual representa graficamente a distância genética entre as populações.

Tabela 3. Alelos privados nas cultivares.

Cultivar	Marcadores	Alelo	Frequência
Ito+	GB-ASM-080	167	1,000
Chon	GB-ASM-072	190	0,438
Chon	GB-ASM-078	210	0,500
Chon	GB-ASM-080	178	0,063

Os resultados referentes à distância genética de Nei (Tabela 4), relacionam as cultivares par-a-par. O maior valor encontrado é referente à comparação entre as cultivares Chonan e Ito+ (0,863) e os menores valores encontrados são referentes às comparações das cultivares Esmeralda e Ito - (0,0) e Quitéria e Fuego-INTA (0,0). Para a comparação entre Quitéria e Contestado e Contestado e Fuego-INTA, o valor apresentado é de 0,003, indicando uma distância genética muito pequena em relação a esses pares de cultivares.

Tabela 4. Distância genética de Nei entre pares de cultivares.

Cultiv.	Ito+	Esme	Ito-	Quit	Cont	Fueg	Roxo	Chon
Ito+	0,000							
Esme	0,255	0,000						
Ito-	0,255	0,000	0,000					
Quit	0,511	0,255	0,255	0,000				
Cont	0,514	0,258	0,258	0,003	0,000			
Fueg	0,511	0,255	0,255	0,000	0,003	0,000		
Roxo	0,805	0,549	0,549	0,112	0,114	0,112	0,000	
Chon	0,863	0,608	0,608	0,217	0,196	0,217	0,259	0,000

Índices dados de valores de diversidade genética, comparando pares de cultivares estudadas. Números destacados em vermelho são referentes aos menores valores, enquanto o número destacado em azul é referente ao maior valor. Valores em destaque verde se referem aos menores valores > 0. Os valores em cinza são as comparações de mesma cultivar,

A variância molecular para todos os parâmetros de comparação (Figura 2; Tabela 6), mostra que a maior parcela de variabilidade das populações se encontra dentro dos indivíduos (76%), enquanto entre todas as cultivares, o valor estimado é de 24% dentre todas as comparações possíveis entre essas populações. A comparação entre indivíduos foi estimada em 0,0%.

Figura 2. Porcentagem da estimativa da variância molecular.

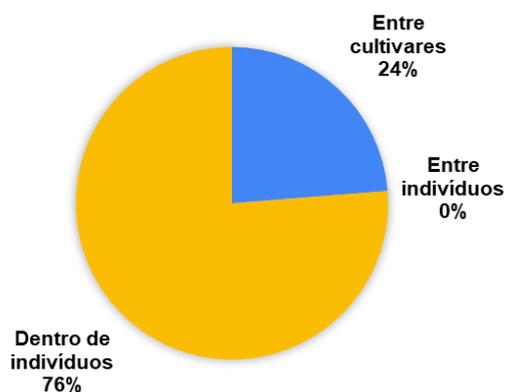
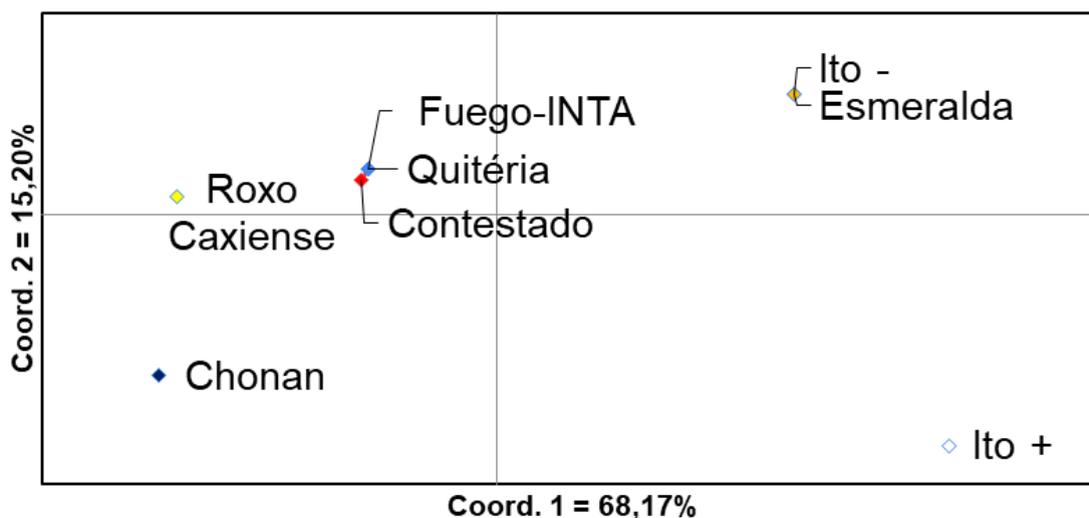


Tabela 6. Tabela AMOVA

Fonte de variação	GL	SQ	QM	Est. Var.	%
Entre populações	7	49,508	7,073	0,435	24%
Entre indivíduos	56	6,188	0,110	0,000	0%
Dentro de indivíduos	64	89,500	1,398	1,398	76%
Total (T)	127	145,195	-	1,834	100%

GL = graus de liberdade, SQ = soma de quadrados, QM = quadrado médio, Est. Var. = estimativa da variância, e porcentagem da variância molecular.

Figura 3. Representação de agrupamentos por similaridade das cultivares. Análise de PCoA.



Para os parâmetros de análise de coordenadas principais em dois eixos (Figura 3), as cultivares encontram-se agrupadas em pontos diversos do plano. Em termos genéticos, as cultivares mais próximas são mais similares, e as cultivares mais distantes são mais diferentes entre si.

No total foram observados dois agrupamentos distintos, sendo um deles composto pelas as cultivares Ito- e Esmeralda e o segundo, formado pelas cultivares Fuego-INTA e Quitéria, o qual se encontra muito próximo à cultivar Contestado. Esse resultado é reforçado por Mota et al., (2006), e Vieira & Nodari (2007) para as cultivares Quitéria e Contestado, as quais apresentaram alta similaridade, quando submetidas às análises genético-moleculares de ambos os estudos. Vieira & Nodari (2007) apresentam resultado diferente, referente às cultivares Chonan e Quitéria, cujo estudo mostra que estas apresentam pouco mais de 95% de similaridade, contudo, no presente estudo, os resultados mostram que existe uma larga diferença genética entre essas cultivares. No entanto, é importante ressaltar que foram utilizados marcadores moleculares diferentes nestes trabalhos. Assim, diferentes regiões do genoma foram avaliadas, podendo representar diferentes relações genético-evolutivas.

As cultivares Ito+, Roxo Caxiense e Chonan, são apresentadas em pontos distintos do gráfico, sem formação de grupos, o que indica diferença entre elas e entre os agrupamentos. Uma vez que as cultivares são determinadas por suas características fenotípicas, pode-se sugerir que há influência genética na morfologia das plantas, e não só influência do manejo e do ambiente os quais as plantas foram submetidas.

Os resultados, mostram que existe diferença genética entre as cultivares, e que a seleção de indivíduos com característica de interesse produtivo e comercial é possível, o que permite o melhoramento das cultivares e a produção plantas com genéticas superiores, possibilitando a competitividade dos alhos do Planalto Catarinense, com os grupos de alhos importados, permitindo a otimização e valorização do trabalho dos agricultores da região. Isso fica claramente demonstrado pela diferença genética observada entre as amostras Ito+ e Ito- que correspondem à mesma cultivar, porém selecionadas como superiores (+) ou inferiores (-) tendo por base características morfológicas de interesse agrônomo.

Conclusões

As análises genético-moleculares sugerem que os marcadores SSR são eficientes na discriminação de cultivares de alho e que existem diferenças genéticas entre cultivares colhidas no Planalto Catarinense, o que sugere que há possibilidade de se fazer seleção de características de interesse e criar genótipos superiores, para a otimização e valorização do trabalho dos agricultores locais, em detrimento do alho importado. Ainda assim, se faz necessário a complementaridade do estudo com os marcadores restantes para um aprofundamento das informações genéticas dessas cultivares

Agradecimentos

Primeiramente agradeço à minha família mamãe Margaret, papai Silvio e maninha Vanessa pelo apoio e paciência. Ao meu amor, Margarida que me garantiu atenção e carinho durante toda essa etapa. Imensamente agradecida ao meu orientador Valdir Stefenon e ao meu coorientador Dalvan Beise pela enorme ajuda e conhecimentos que possibilitaram a execução desse trabalho. Aos meus amigos e colegas que cruzaram meu caminho durante toda a jornada e que complementaram minha formação enquanto estudante de Agronomia da universidade pública. E enormemente à Universidade Federal de Santa Catarina.

Literatura citada

AGRAMA, H. A.; EIZENGA, G. C.; YAN, Wengui. Association mapping of yield and its components in rice cultivars. **Molecular breeding**, v. 19, n. 4, p. 341-356, 2007.

BRADLEY, K. .; RIEGER, M. A.; & COLINS, G. G. **Classification of Australian garlic cultivars by DNA fingerprinting**. Australian Journal of Experimental Agriculture, 36(5), 613. 1996.

CUNHA, Camila P. *et al.* New microsatellite markers for garlic, *Allium sativum* (Alliaceae). **American Journal of Botany**, v. 99, n. 1, p. e17-e19, 2012.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Produção de Alho no Brasil**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/alho/br>> Acesso em 02 de jul. de 2022.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Resultados do Censo Agro 2017**. Disponível em: <https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/agricultura.html?localidade=0&tema=76416> Acesso em 02 de jul. de 2022.

KIK C, Kahane R, Gebhardt R. Garlic and health. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.** (4 Suppl):57-65. PMID: 11894756. Agosto de 2001.

LAMPASONA, G.S., MARTÍNEZ, L., BURBA, J.L. **Genetic diversity among selected Argentinean garlic clones (*Allium sativum* L.) using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) Source.** Euphytica 132, 115–119. 2003.

LANDAU, E. C.; BARTOLOMEU, RD de S.; DA SILVA, G. A.; Evolução da produção de alho (*Allium sativum*, Amaryllidaceae). **Embrapa Milho e Sorgo-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2020.

LOPES, W. A. R.; NEGREIROS, M. Z. RESENDE, F. V.; LUCENA, R. R. M.; SOARES, A. M.; SILVA, O. M. P.; MEDEIROS, J. F. Produção de alho submetido a períodos de vernalização e épocas de plantio em região de clima semiárido. **Horticultura Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 249-256, abr./jun. 2016

MA, Kyung-Ho et al. Isolation and characteristics of eight novel polymorphic microsatellite loci from the genome of garlic (*Allium sativum* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 122, n. 3, p. 355-361, 2009.

MOTA, José H. et al. Similaridade genética de cultivares de alho pela comparação de caracteres morfológicos, físico-químicos, produtivos e moleculares. **Horticultura Brasileira**, v. 24, p. 156-160, 2006.

NICK, C; BORÉM, A. **Alho: do plantio à colheita**. Viçosa, MG: pág. 12. Ed. UFV, 2017.

RESENDE, F. V. Desafios da produção e inovações tecnológicas para cultura do alho no Brasil. **Hortaliças em Revista**, ano 7, n. 25, p. 16-17, maio/ago. 2018.

RESENDE, F. V.; HABER, L. L.; PINHEIRO, J. B.; MELLO, A. F. S. **Revista Nosso Alho**, Brasília, DF, n.29, out. 2018. Disponível em:

<anapa.com.br/wp-content/uploads/2018/11/revista-nosso-alho-edicao-29.pdf>

Acesso em 18 de julho de 2022.

SCHUELKE, Markus. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 233-234, 2000.

VIEIRA, Renato Luis; NODARI, Rubens Onofre. Diversidade genética de cultivares de alho avaliada por marcadores RAPD. **Ciência Rural**, v. 37, p. 51-57, 2007.

VOLK, G.M. *et al.* Genetic diversity among U. S. garlic clones detected using AFLP methods. **Journal of American Society of Horticultural Sciences**, v.129, n.4, p.559-569, 2004.