



ISABELLE PONCIANO ALMEIDA

**MARCADORES MICROSSATELITES E ENSAIO ELISA
AUXILIAM NA SELEÇÃO DE LINHAGENS NO
MELHORAMENTO GENÉTICO DO MILHO**

**LAVRAS – MG
2023**

ISABELLE PONCIANO ALMEIDA

**MARCADORES MICROSSATELITES E ENSAIO ELISA AUXILIAM NA SELEÇÃO
DE LINHAGENS NO MELHORAMENTO GENÉTICO DO MILHO**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Genética e Melhoramento de Plantas para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Welison Andrade Pereira
Orientador

Dra. Izabel Costa Silva Neta
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Almeida, Isabelle Ponciano.

Marcadores microssatélites e ensaio Elisa auxiliam na
seleção de linhagens no melhoramento genético do milho. /
Isabelle Ponciano Almeida. - 2023.

65 p.

Orientador(a): Welison Andrade Pereira.

Coorientador(a): Izabel Costa Silva Neta.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade
Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Zea mays. 2. Retrocruzamento. 3. Elisa. I. Pereira,
Welison Andrade. II. Silva Neta, Izabel Costa. III. Título.

ISABELLE PONCIANO ALMEIDA

**MARCADORES MICROSSATELITES E ENSAIO ELISA AUXILIAM NA SELEÇÃO
DE LINHAGENS NO MELHORAMENTO GENÉTICO DO MILHO**

**MICROSSATELLITE MARKERS AND ELISA ASSISTS IN THE SELECTION OF
LINEAGES IN CORN GENETIC IMPROVEMENT**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação do Mestrado Profissional em Genética e Melhoramento de Plantas para obtenção do título de Mestre.

APROVADA EM 27 DE Março de 2023
Prof. Dr. Welison Andrade Pereira - UFLA
Dra. Izabel Costa Silva Neta - UFLA
Dra. Aurinelza Batista Teixeira Condé- EPAMIG

Prof. Dr. Welison Andrade Pereira
Orientador

Dra. Izabel Costa Silva Neta – UFLA
Co-Orientadora

**LAVRAS – MG
2023**

AGRADECIMENTOS

Foram momentos difíceis e longos durante este processo. Neste tempo, foram inúmeras as pessoas que estiveram me apoiando, incentivando, e que não me deixaram desistir. E no final desse trajeto tudo foi muito gratificante. Agradeço primeiramente a Deus e à nossa senhora que esteve comigo a todo instante. Agradecimento mais que especial à minha irmã Isadora Ponciano Almeida que, além de ser minha alma gêmea, foi meu espelho e incentivo para iniciar e finalizar o mestrado. Aos meus pais Dalci Saraiva dos Santos e Israel Antônio Ponciano Almeida por estarem sempre presentes e apoiarem minhas escolhas com muito amor, carinho e atenção. Ao meu esposo Mateus Henrique de Matos Silva por todo companheirismo e reconhecimento em todas as fases desta caminhada.

Um agradecimento com muito carinho à minha amiga Adriane das Graças Silva por toda ajuda, incentivo, palavras de sabedoria em todos os momentos, pelo companheirismo nas rotinas da vida. Às minhas amigas Gizele Pires de Moura, Patrícia e Lorena por estarem comigo nas rotinas laboratoriais e por todo incentivo e alegrias diárias.

À equipe do projeto OGM da empresa Helix Sementes e Biotecnologia Ltda por todo apoio no desenvolvimento do projeto de pesquisa, por toda ajuda e ensinamentos compartilhados. Em especial, à Isabela Moares Ascencio e Lidiane Aparecida Silva por toda ajuda, paciência, conhecimentos compartilhados durante todo o desenvolvimento do projeto.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao departamento de Biologia pela oportunidade.

Ao meu orientador Welison Andrade Pereira pelos ensinamentos, orientações e didática em suas aulas ministradas.

À minha coorientadora e colega de empresa, Izabel Costa Silva Neta, por todo ensinamento, orientação e pelo incentivo, apoio e, acima de tudo, pela amizade e carinho. Agradeço também à minha supervisora e coordenadora, Milena Christy dos Santos e Cristiane Carvalho Pereira, pelos inúmeros conselhos, amizade, e oportunidade de fazer o mestrado profissional.

A todos que, de alguma forma, contribuíram com amizade, dedicação e apoio para que eu chegasse ao final dessa etapa da minha vida. Deixo aqui registrado meus sinceros e eternos agradecimentos.

RESUMO

A crescente demanda pelo aumento da produção de grãos, aliada à redução significativa da performance produtiva desencadeada pelo ataque de pragas, torna a cultura do milho (*Zea mays*) um dos principais alvos da tecnologia de transgênicos. Os transgênicos presentes atualmente no mercado objetivam a proteção de culturas ao ataque de pragas, resistência a herbicidas e à seca, e dentre outros benefícios que, conseqüentemente, contribuem para o bom desempenho da cultura geneticamente modificada. Linhagens transgênicas desenvolvidas após a transformação genética desempenham o papel de genitores doadores durante o processo de introgressão de um novo transgene nos programas de melhoramento. Estes doadores são então cruzados com genitores recorrentes, os quais constituem linhagens com características agrônômicas desejáveis. Os genótipos oriundos deste cruzamento são novamente cruzados com o parental recorrente, processo designado como retrocruzamento. Este processo de conversão pode ser estendido até que se obtenha linhagens com fixação satisfatória dos alelos do genitor recorrente e ao mesmo tempo, que expressem o transgene da linhagem doadora. O uso da seleção assistida por marcadores (SAM) e de ensaios ELISA no melhoramento são ferramentas que podem auxiliar na seleção de linhagens durante o processo de melhoramento. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência do uso de marcadores moleculares microsatélites (SSR) e do ensaio ELISA para avaliação da taxa de fixação de alelos e quantificação da proteína transgênica, respectivamente, de populações, em diferentes estágios de conversão, referentes a 3 linhagens (L1, L2 e L3). Para avaliação da taxa de recuperação por SSR, foram conduzidas extrações de DNA de cada indivíduo a ser analisado. O DNA foi então submetido à amplificação utilizando marcadores SSR, previamente selecionados de acordo com o perfil polimórfico entre genitores doadores e recorrentes. Os produtos de PCR obtidos foram avaliados em analisador genético e, a partir dos resultados, foi feita a inferência da taxa de fixação dos alelos do genitor recorrente para cada linhagem analisada. Para avaliação da expressão do transgene, foi realizada a extração de proteínas totais. O extrato proteico obtido de cada linhagem foi utilizado para quantificação da proteína alvo utilizando ELISA competitivo. A similaridade genética inferiu que a L1 apresentou taxa de recuperação entre 98,438 até 100,00% já na quarta geração de retrocruzamento e três gerações de autofecundação (RC4S3). Por outro lado, na L2 após cinco gerações de retrocruzamentos e duas gerações de autofecundação (RC5S2) apresentou recuperação de 86,111%. A L3, apresentou recuperação de 100,00% já na terceira geração de retrocruzamento e cinco gerações de autofecundação (RC3S5). O ensaio Elisa apresentou eficiência para a detecção das concentrações proteicas de todos os indivíduos analisados. Além disso, foi constatado que nas linhagens L1 e L3 não houve variação na concentração das proteínas entre indivíduos em diferentes estágios de conversão, indicando que os sucessivos retrocruzamentos não interferiram negativamente na expressão do transgene em estudo. No entanto, para as amostras analisadas da L2, a detecção proteica foi ineficiente e foi observada oscilação da concentração proteica entre diferentes estágios de conversão.

Palavras-chave: *Zea Mays*. Retrocruzamento. Elisa

ABSTRACT

The growing demand for increased grain production, combined with the significant reduction in productive performance triggered by pest attacks, makes corn (*Zea mays*) one of the main targets of transgenic technology. The transgenics currently on the market aim to protect crops from pest attack, resistance to herbicides and drought, and among other benefits that, consequently, contribute to the good performance of the genetically modified crop. Transgenic lines developed after genetic transformation play the role of donor parents during the introgression process of a new transgene in breeding programs. These donors are then crossed with recurrent parents, which constitute lines with desirable agronomic characteristics. The genotypes resulting from this crossing are crossed again with the recurrent parent, a process known as backcrossing. This conversion process can be extended until obtaining lines with satisfactory fixation of the recurrent parent's alleles and, at the same time, expressing the transgene of the donor lineage. The use of marker-assisted selection (SAM) and ELISA assays in breeding are tools that can help in the selection of lines during the breeding process. Therefore, the objective of this work was to verify the efficiency of using microsatellite molecular markers (SSR) and the ELISA assay to evaluate the rate of allele fixation and quantification of the transgenic protein, respectively, of populations, at different stages of conversion, referring to 3 strains (L1, L2 and L3). To assess the rate of recovery by SSR, DNA extractions were conducted from each individual to be analyzed. The DNA was then subjected to amplification using SSR markers, previously selected according to the polymorphic profile between donor and recurrent parents. The obtained PCR products were evaluated in a genetic analyzer and, from the results, the inference of the rate of fixation of the alleles of the recurrent parent was made for each strain analyzed. To evaluate the expression of the transgene, the extraction of total proteins was performed. The protein extract obtained from each strain was used to quantify the target protein using competitive ELISA. The genetic similarity inferred that L1 presented a recovery rate between 98.438 and 100.00% already in the fourth generation of backcrossing and three generations of selfing (RC4S3). On the other hand, in L2 after five generations of backcrossing and two generations of selfing (RC5S2) it presented recovery of 86.111%. L3 showed recovery of 100.00% already in the third generation of backcrossing and five generations of selfing (RC3S5). The Elisa assay was efficient for detecting the protein concentrations of all analyzed individuals. Furthermore, it was found that in the L1 and L3 strains there was no variation in protein concentration between individuals at different stages of conversion, indicating that successive backcrosses did not negatively interfere with the expression of the transgene under study. However, for the samples analyzed from L2, protein detection was inefficient and protein concentration oscillation between different stages of conversion was observed.

Keywords: Zea Mays. Backcrossing. Elisa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 Espécie do milho: Estatísticas de produção e produtividade	11
2.2 Produtividade do milho.....	12
2.3 Melhoramento genético de milho	12
2.3.1 Milho transgênico	12
2.3.2 Método dos Retrocruzamentos.....	13
2.3.3Retrocruzamento assistido por marcadores moleculares	14
2.4 Técnicas Moleculares no melhoramento genético	14
2.4.1 Marcadores moleculares	14
2.4.2 Marcadores SSR	15
2.4.3 Elisa competitivo.....	16
3 OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo Geral	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Plantio	17
4.2 Coleta para Genotipagem e Análise da proteína-alvo por ELISA.....	18
4.3 Extração do DNA para genotipagem.....	20
4.4 Seleção de marcadores polimórficos entre o genitor recorrente e doador por PCR convencional.....	20
4.5 Análise dos fragmentos polimórficos	21
4.6 Obtenção da taxa de recuperação do genoma recorrente nas linhagens L1, L2 e L3	22
4.7 Extração de proteínas para ensaio ELISA	22
4.8 Quantificação de proteínas por Elisa Competitivo.....	23
4.9 Análise estatística.....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Marcadores SSR polimórficos selecionados para análise da recuperação do genoma recorrente.....	25

5.2. Taxa de recuperação do genitor recorrente	26
5.3. Análise gráfica da distribuição cromossômica e locus recuperados para o genitor recorrente	29
5.4 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)	35
5.4.1 Curvas e padrão do ensaio	35
5.4.1.1 Curvas e padrões para as três linhagens (L1, L2 e L3)	35
5.4.1.2 Coeficiente de variação das amostras das linhagens (L1, L2 e L3).....	40
6 CONVERSÃO	42
7 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
APÊNDICE	54
ANEXO I	59

1 INTRODUÇÃO

O milho é um dos cereais mais cultivados no mundo. No Brasil, a estimativa para produção da cultura na safra de 2022/2023 foi de 125,8 milhões de toneladas (CONAB, 2022). Durante a produção, eventos indesejados, como o ataque por pragas, podem acontecer comprometendo a produção das plantas de milho, interferindo na qualidade dos grãos e das sementes (EMBRAPA, 2015).

Diante disso, o controle de pragas em culturas do milho é primordial para a obtenção de resultados de qualidade e garantia de uma maior produtividade na colheita (FUENTES, 2019). Desta maneira, a partir da garantia do controle de eventuais ações indesejáveis de pragas, torna-se possível elevar a produção da safra.

Os principais métodos de controle de pragas envolvem o uso de inseticidas e linhagens transgênicas que apresentem genes com a tecnologia Bt (*Bacillus thuringiensis*). Os genes Bt, oriundos de uma bactéria gram-positiva *Bacillus thuringiensis*, são responsáveis por sintetizar toxinas, denominadas Cry, com propriedades inseticidas. Essas proteínas, quando expressas por plantas, atuam protegendo-as de ataques dos insetos e favorecem o seu cultivo, reduzindo custos operacionais e, conseqüentemente, promovendo maior produtividade. No contexto da transgenia, o Brasil encontra-se na terceira posição mundial em relação à área plantada com eventos transgênicos, correspondendo a 15,8 milhões de hectares (ZATERKA, 2019).

Diante desse cenário, os avanços em Biotecnologia permitiram o desenvolvimento de análises, como ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), que possibilitam o acompanhamento do desenvolvimento de cultivares transgênicas, permitindo a análise da expressão proteica e seleção assistida por marcadores (SAM) em retrocruzamentos, que possibilitam analisar a taxa de recuperação do genitor recorrente. Estes ensaios podem ser desenvolvidos em laboratório e manipulados por profissionais capacitados (DATUKISHVILI, 2015). Em contrapartida, experimentos de campo podem ser laboriosos e custosos (ZATERKA, 2019), e metodologias com base em biologia molecular podem contribuir nesse aspecto.

As técnicas moleculares são ferramentas assertivas, que aceleram o processo de melhoramento genético de plantas. Sabe-se que durante o processo de melhoramento, a introgressão de novos genes é feita entre 4 a 6 etapas de retrocruzamentos para fixação do alelo de interesse. A análise de todos os genótipos das progênies obtidas de cada cruzamento

pode ser conduzida utilizando marcadores fenotípicos. No entanto, a interação genótipo por ambiente pode dificultar o processo de seleção. Dessa forma, os marcadores moleculares atuam como ferramentas confiáveis ao analisar a planta em nível molecular e, ao mesmo tempo, reduzir o tempo de seleção dos melhores genótipos.

O uso dos marcadores moleculares possibilita a análise da espécie em estudo ao nível de DNA. Uma das grandes vantagens de se usar os marcadores moleculares no método do retrocruzamento é o fato de que estes também confirmam a introgressão dos alelos de interesse. Por isso, a utilização de marcadores moleculares no melhoramento de plantas é importante por tratar-se de uma ferramenta rápida e eficiente para o desenvolvimento de novas cultivares.

Os marcadores moleculares são ferramentas que aceleram a introgressão de eventos transgênicos por meio do retrocruzamento. Os marcadores possibilitam a identificação de indivíduos que apresentem maior proporção do genoma recorrente em um tempo mais curto, podendo gerar um ganho de até 3 ciclos (RAMOS, 2018). Contudo, além dos marcadores moleculares, o uso de ensaios imunoenzimáticos permite analisar a expressão do gene exógeno inserido em nível de proteína.

Aliado a SAM, os ensaios ELISA permitem aos melhoristas e biotecnologistas selecionarem os melhores genótipos, que apresentem melhor performance agrônômica, bem como, selecionar aqueles que apresentam perfil satisfatório de expressão do transgene inserido.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Espécie do milho: Estatísticas de produção e produtividade

O milho (*Zea mays L.*), pertencente à família *Poaceae*, é uma das espécies mais importantes para a cultura brasileira, destacando-se desde a alimentação até a pesquisa científica (FONTANIVE, 2019). Trata-se de uma das mais importantes commodities para o agronegócio brasileiro, que lidera a produção mundial de grãos, destacando-se tanto em área de cultivo quanto em produção no país (SILVA, 2020). Esta cultura encontra-se diretamente ligada à nutrição humana e de outros animais.

Na primeira safra brasileira de 2022, foi observado um aumento da área plantada para a cultura do milho de 11,6%. Na segunda safra, a expectativa de área registrou 576,4 mil hectares, 16,3% (CONAB, 2022).

O milho é essencial para todos os países que o produzem, inclusive para aqueles que apresentam baixa produção, não somente para o agronegócio, como também para alimentação humana e animal. Este vegetal se faz presente na vida de produtores de pequeno e grande porte e ganha cada vez mais espaço, aumentando sua produção anual.

2.2 Produtividade do milho

A população mundial apresenta uma taxa de crescimento acelerada e contínua, o que eleva a demanda e, conseqüentemente, o consumo de alimentos em geral (SAATH, 2018). Como exemplo, de acordo com dados do IBGE (2021), a população brasileira chegou a mais de 220 milhões de habitantes.

Com o aumento populacional previsto, há a necessidade de aumento da produtividade do milho no setor agrônomo, que, de acordo com a CONAB, tem estimativa de 6.416 quilos por hectare. Pode-se dizer que tal estimativa se deve principalmente às técnicas existentes no melhoramento genético, que aumentam tanto a produtividade quanto a adaptabilidade deste cereal em ambientes de estresse, fazendo com que seu desenvolvimento seja estável.

Como comenta Krishnappa et al. (2021), o aumento na taxa de melhoramento da cultura é essencial para se alcançar a produção sustentada de alimentos, sendo esta uma das principais necessidades da população que cresce cada vez mais. O melhoramento genético é um dos principais fatores que proporcionam ganho de produtividade nas safras anuais de alimentos.

2.3 Melhoramento genético de milho

2.3.1 Milho transgênico

A demanda por milho cresce, fazendo com que essa espécie seja alvo das indústrias de biotecnologia, pois é sabida a importância dos transgênicos no controle de insetos, ervas daninhas, entre outros, o que contribui para o aumento da produtividade.

O intuito da transgenia varia de acordo com o objetivo a ser alcançado, pois este recurso possibilita modificações em nível de inserção de genes específicos no genoma de uma espécie, gerando novos genótipos que manifestam características agrônômicas de interesse (EMBRAPA, 2018).

Portanto, o método da transgenia consiste na inserção de um gene de uma espécie em uma segunda espécie receptora, que, por sua vez, irá expressar uma característica que não

possuía antes. Alterações assim podem ser controladas por meio de estudos do produto, para se verificar se o mesmo equivale ao produto não modificado (EMBRAPA, 2018).

2.3.2 Método dos Retrocruzamentos

O método do retrocruzamento permite a transferência de um ou poucos genes de um genitor doador para um receptor. Portanto, neste método está presente um genótipo doador e outro receptor, sendo que este último recebe a (s) característica (s) que se deseja introduzir (SOUZA, 2021).

O método do retrocruzamento é utilizado em diversas espécies, principalmente para aquelas que apresentam cultivo de autopolinização e de polinização cruzada (ORTON, 2020). Muitas das vezes, os melhoristas adotam de quatro a seis rodadas de retrocruzamentos para a fixação dos alelos de interesse do genótipo recorrente (Tabela 1).

Tabela 1 - Recuperação esperada do genótipo do genitor recorrente durante as sucessivas gerações de retrocruzamento.

Geração	% GR
F₁	50,00
RC₁	75,00
RC₂	87,50
RC₃	93,75
RC₄	96,87
RC₅	98,43
RC₆	99,21
RC₇	99,60

Nota: %GR (Porcentagem genótipo recorrente)

Fonte: Mesquita (2017).

Tanto o mercado quanto os agricultores procuram materiais elites que ofereçam produtividade elevada para suas lavouras, sendo este um dos principais intuitos do método do retrocruzamento: oferecer genótipos de confiança, que sejam bastante produtivos e valiosos comercialmente.

Uma das limitações do método é o tempo para obtenção da linhagem elite com a fixação do gene de interesse. Em média, gastam-se entre 2 a 3 anos neste objetivo, e uma das alternativas para reduzir este tempo, é a utilização de marcadores moleculares, que vão auxiliar de forma mais precisa na seleção de plantas que apresentem maior proporção de genoma recorrente em cada geração de retrocruzamento (SOUZA, 2021).

2.3.3 Retrocruzamento assistido por marcadores moleculares

O retrocruzamento assistido por marcadores moleculares SSR consiste no monitoramento de similaridade genética entre os indivíduos da progênie e os pais recorrentes. Com os marcadores polimórficos, a identificação dos indivíduos é acurada e, assim, a recuperação do genoma recorrente pode ser alcançada em 3 a 4 gerações de retrocruzamentos. Desta forma, o número de etapas de retrocruzamentos pode ser reduzido pela semelhança das plantas analisadas com o genitor recorrente (MESQUITA, 2002).

O método do retrocruzamento possibilita melhorar cultivares elite dentro do programa de melhoramento, que apresentem as características de interesse. Para aplicação e utilização desta ferramenta, são necessárias algumas informações, tais como o tamanho da população a cada geração de retrocruzamento e o número de marcadores moleculares disponíveis (BERNARDELI, 2019).

2.4 Técnicas Moleculares no melhoramento genético

2.4.1 Marcadores moleculares

De acordo com estudos de Jiang (2017), marcador molecular é um pequeno segmento ou seção de sequência de DNA que pode revelar polimorfismo entre diferentes indivíduos. Os marcadores, quando ligados a um gene de interesse, podem ser utilizados para discriminar alelos ou genótipos divergentes em sequências de DNA.

Os marcadores de DNA são explorados como ferramentas da biotecnologia moderna, podendo ser utilizados em diversas áreas da pesquisa, seja com humanos, outros animais, microrganismos, vegetais, dentre outros (CANÇADO *et al*, 2012).

Desde a descoberta do DNA, a genética molecular experimentou extraordinário avanço, o qual passou pelo desenvolvimento de métodos de análise da estrutura e da função do material genético (REGITANO; VENERONI 2009).

O uso dos marcadores moleculares é atualmente uma das principais ferramentas para pesquisas genéticas, pois, são abundantes, oferecem cobertura total do genoma em estudo, e não sofrem interferência do ambiente (DEVI *et al*, 2017).

Os marcadores moleculares são divididos em dois grupos: Os marcadores obtidos por hibridização, como o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), e aqueles obtidos por amplificação de DNA, onde se enquadram o RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), STS (Sequence Tagged Sites),

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e SSR (Simple Sequence Repeats) (OLIVEIRA, 2021).

Os marcadores de DNA são utilizados no melhoramento de plantas principalmente em casos em que a seleção direta para um determinado fenótipo não pode ser realizada ou é de difícil execução. Estes marcadores de DNA são sinais de características em uma planta a nível molecular (JIANG, 2017).

No melhoramento genético de plantas o uso de marcadores moleculares é de grande interesse, uma vez que, estando próximo a genes controladores de caracteres morfo-agronômicos importantes, permitem o acesso à diversidade genética, facilitando a escolha do genitor e aumentando a eficiência dos cruzamentos (MELO, 2018).

Marcadores genéticos moleculares são ferramentas poderosas com vantagens em termos de economia de tempo, menor consumo de mão de obra e maior eficiência. De fato, uma das principais vantagens da aplicação dos marcadores de DNA no programa de melhoramento é mesmo a economia de tempo para obtenção dos resultados.

2.4.2 Marcadores SSR

Os marcadores microssatélites são ferramentas essenciais para a biologia molecular, por apresentarem características polimórficas que podem ser utilizadas em muitas aplicações genéticas (LIM, 2021).

Em plantas, os marcadores microssatélites foram rapidamente implementados em várias espécies, e são utilizados até o momento para diferentes atividades científicas, tais como a construção de mapas genéticos, estudos de diversidade genética, e seleção assistida (GUIMARÃES *et al*, 2009).

Nos programas de melhoramento genético, a aplicação dos marcadores moleculares SSR é também eficiente durante os avanços das gerações, sendo que são ferramentas com possibilidades de analisar todo o genoma da espécie, considerando relações entre indivíduos e populações (SILVA *et al*, 2019).

Marcadores SSR são desenvolvidos para amplificação por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase (*polymerase chain reaction* – PCR), aplicando primers que apresentem, em média, 20 pares de bases na sua extensão, podendo ser aplicados na seleção assistida de retrocruzamentos (SILVA *et al*, 2019).

2.4.3 Elisa competitivo

Análises como ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA – do inglês *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) podem ser desenvolvidas em laboratório e manipuladas por profissionais capacitados para melhor monitoramento de um transgene e de proteínas presentes nos produtos transgênicos (DATUKISHVILI, 2015).

O teste de Elisa é uma das análises estipuladas na instrução Normativa Interministerial n.01, de 1º de abril de 2004 no Brasil, podendo ser utilizado para detectar e quantificar proteínas em determinados produtos resultantes de modificação genética (COBAIASHI, 2012; MAPA, 2004).

O ensaio de Elisa possibilita a identificação da proteína correspondente ao transgene inserido no genoma do material. O teste se baseia no uso de anticorpos conjugados a enzimas para detecção específica de determinado alvo. A enzima tem por função catalisar a reação do substrato fornecido durante o ensaio e posteriormente fornecer a coloração que distingue amostras positivas e negativas para o alvo em estudo (KONSTANTINO, 2017).

O ensaio de ELISA pode ser conduzido em quatro diferentes abordagens: direta, indireta, sanduíche e competitiva (SHAH & MAGHSOUDLOU, 2016). Na primeira, tem-se a imobilização do alvo e detecção direta com apenas um anticorpo conjugado (LIN, 2015). Por outro lado, ensaios indiretos envolvem o uso de um anticorpo primário que se liga ao antígeno imobilizado. Posteriormente, um anticorpo conjugado é adicionado, o qual apresenta especificidade de ligação para o anticorpo primário (BERLINA *et al*, 2019).

Abordagens envolvendo ELISA-sanduíche envolvem a imobilização de um anticorpo de captura, seguida da adição da amostra em estudo e, em seguida, de um anticorpo conjugado. Os anticorpos utilizados no formato sanduíche se ligam a epítomos diferentes do antígeno (QIN *et al*, 2020). Por outro lado, o ELISA competitivo utiliza uma molécula conjugada, a qual compete com a proteína-alvo pela ligação ao anticorpo de captura. Dessa forma, amostras positivas para o alvo em estudo não apresentam a coloração resultante da quebra do substrato fornecido, enquanto amostras negativas apresentam-na devido à ligação do anticorpo de captura e molécula conjugada (XIONG *et al*, 2020). O ELISA competitivo apresenta vantagens, tais como maiores potenciais de detecção e melhor perfil de quantificação de moléculas de baixo peso molecular (TRAN *et al*, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi verificar, em populações de 3 linhagens (L1, L2 e L3) em diferentes estágios de conversão, a eficiência do uso de marcadores moleculares microssatélites (SSR) para avaliação da taxa de fixação do genótipo do genitor recorrente e do ensaio de ELISA para a quantificação da proteína transgênica.

3.2 Objetivos específicos

- Selecionar marcadores polimórficos entre o genitor recorrente e doador;
- Avaliar marcadores polimórficos em plantas selecionadas para genotipagem;
- Avaliar fixação dos loci do genitor recorrente nas plantas selecionadas;
- Verificar a expressão proteica nas plantas selecionadas dentro de cada genótipo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Plantio

Foram semeadas sementes de três genótipos sob informações confidenciais, denominadas como Linhagem 1, 2, e 3 (L1, L2 e L3), que por sua vez, encontram-se em diferentes gerações de retrocruzamento. Neste sentido, foi avaliado um espectro de plantas em diferentes gerações. As sementes pertencem ao banco de germoplasma da Helix Sementes e Biotecnologia, e foram armazenadas sob condições de câmara fria (12 °C e umidade de 50-55 %), no Laboratório de Biotecnologia.

Para a semeadura, o substrato foi devidamente preparado com mistura de 100 litros de solo, 40 quilos de substrato vegetal (Bioplant), e 25 litros de areia lavada. O solo foi misturado por 5 minutos e a mistura (solo+areia+substrato) foi distribuída em vasos plásticos de 25 L até à metade de sua capacidade em volume. Então, foram adicionados sobre a mistura 272 g de fertilizante formulado com Nitrogênio, Fósforo e Potássio (NPK) 30.08.10. Em seguida, cada vaso foi completado com a mistura (solo+areia+substrato) e acondicionado em casa de vegetação, com temperatura (20 a 33 °C) e umidade (18 a 90 %) controladas, na fazenda Paraíso, cidade de Patos de Minas – Minas Gerais (18°45'29.04''S e 46°38'24.36''O).

O início do processo para cada linhagem iniciou com uma quantidade de vasos diferentes, para a linhagem 1 foram inicialmente (43 vasos), para a linhagem 2 (26 vasos) e para a linhagem 3 (25 vasos), nestes vasos as sementes foram semeadas e os mesmos foram

identificados e receberam irrigação, posteriormente, foram semeadas dez sementes de cada linhagem, e após a emergência, algumas plantas foram desbastadas, permitindo até 4 plantas por vaso.

4.2 Coleta para Genotipagem e Análise da proteína-alvo por ELISA

Os genótipos foram destinados às análises quanto à taxa de recuperação genômica dos genitores recorrentes por genotipagem, utilizando marcadores moleculares microssatélites SSR, e inferência da concentração da proteína-alvo no tecido vegetal pelo teste de Elisa.

Para genotipagem, realizada entre os estágios fenológicos V6-V8, foram coletados 4 discos foliares de 6 mm de diâmetro de um total de 38 plantas, incluindo os controles experimentais, que são as linhagens convencionais, sem o evento transgênico. O tamanho das amostras variou entre as linhagens, sendo 15 plantas para a linhagem 1 (L1), 16 plantas para a linhagem 2 (L2), e 7 plantas para linhagem 3 (L3) (Tabela 2).

Para análise da proteína-alvo por Elisa, foi coletado um número maior de plantas, por critério do melhorista da empresa. Foram coletadas, 23, 21 e 13 plantas para as linhagens L1, L2 e L3, respectivamente, totalizando 57 plantas, incluindo os controles experimentais, que são as linhagens convencionais, sem o evento transgênico (tabela 3).

Os materiais coletados para genotipagem e Elisa foram transportados em gelo seco para armazenamento em ultra freezer, a -80°C, até a extração de DNA e proteína.

Tabela 2 – Plantas analisadas no teste de genotipagem

Geração	Plantas L1	Geração	Plantas L2	Geração	Plantas L3
RC4S3	P1	RC3S5	P1	RC3S5	P1
	P2		P2		P2
	P3	RC5S2	P14		P4
P5	P16		P7		
RC5S2	P8	RC6S1	P4	RC4S2	P10
	P11		P6	RC5S1	P9
	P13		P8	Linhagem	P13
RC6S1	P16	RC6S1	P9		
	P17		P10		
	P18		P11		
	P19		P12		
	P20		P13		
RC7	P21		P17		
	P22		P19		
Linhagem	P23	RC7	P20		
		Linhagem	P21		

Fonte: Do autor (2023).

Tabela 3 - Plantas analisadas no teste de Elisa

Geração	Plantas L1	Geração	Plantas L2	Geração	Plantas L3
RC4S3	P1	RC3S5	P1	RC3S5	P1
	P2		P2		P2
	P3		P3		P3
	P4	P14	P4		
RC5S2	P5	RC5S2	P15		P5
	P6		P16		P6
	P7	P4	P7		
	P8	P5	P8		
	P9	P6	P10		
	P10	P7	P11		
	P11	P8	P12		
	P12	P9	P9		
	P13	RC6S1	P10	Linhagem	P13
	P14		P11		
P15	P12				
RC6S1	P16		P13		
	P17		P17		
	P18		P18		
	P19		P19		
	P20	RC7	P20		
RC7	P21	Linhagem	P21		
	P22				
Linhagem	P23				

Fonte: Do autor (2023).

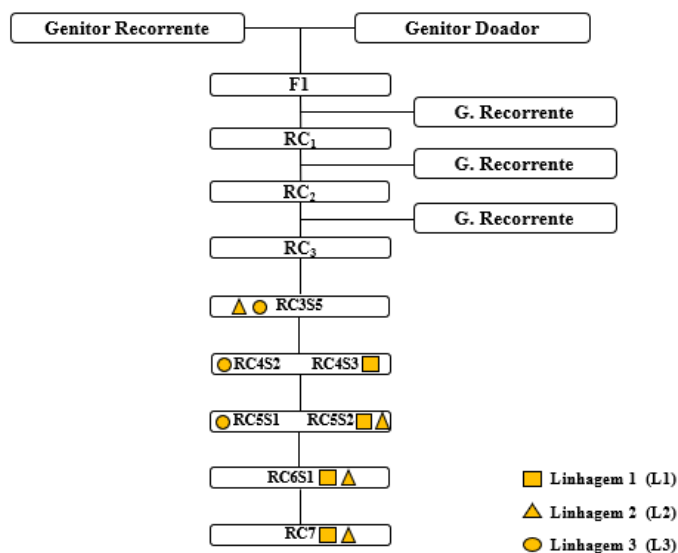
Como mencionado anteriormente o número de plantas para os dois testes se diferem por critério de seleção do melhorista da empresa. Dessa forma, algumas plantas fizeram os dois testes (Genotipagem e Elisa) mas outras plantas foram submetidas à apenas uma das análises.

No caso da L1, para o teste de genotipagem, há três plantas da geração RC4S3, quatro plantas da geração RC5S2, cinco plantas da geração RC6S1 e duas plantas da geração RC7 do retrocruzamento. Para a L2 foram duas plantas da geração RC3S5, duas plantas da geração RC5S2, dez plantas da geração RC6S1 e uma planta da geração Rc7. E por fim, para a L3, foram coletadas quatro plantas da geração RC3S5, uma planta da geração RC4S2 e uma planta da geração RC5S1 (Figura 1).

Para o teste de Elisa, na L1 há 4 plantas da geração RC4S3, onze plantas da geração RC5S2, cinco plantas da geração RC6S1 e duas plantas da geração RC7. Para a L2 foram três plantas da geração RC3S5, três plantas da geração RC5S2, treze plantas da geração RC6S1 e

uma planta da geração RC7. E por fim, para a L3, foram coletadas oito plantas da geração RC3S5, três plantas da geração RC4S2 e uma planta da geração RC5S1 (Figura 1).

Figura 1 - Gerações de retrocruzamentos e autofecundações das plantas coletadas das linhagens 1, 2 e 3 (L1, L2 e L3)



Fonte: Do autor (2023).

4.3 Extração do DNA para genotipagem

A extração de DNA foi realizada a partir dos tecidos foliares coletados de cada planta e para os genitores (Doador e recorrente) de cada um dos genótipos em estudo. O DNA genômico foi extraído de acordo com o protocolo TRITON X100-SDS (DIEGO, 2019) e, em seguida, tratado com RNase (1mg/mL). Após a purificação, o DNA foi armazenado a -20°C e a quantificação do DNA foi realizada no Nanodrop Lite.

4.4 Seleção de marcadores polimórficos entre o genitor recorrente e doador por PCR convencional

Os marcadores microssatélites utilizados neste estudo apresentam sequências nucleotídicas conhecidas disponíveis no banco de dados *Mayse Genome Database*, com as sequências nucleotídicas e temperaturas de anelamento descritas no apêndice A.

A primeira análise de genotipagem envolveu o uso de 100 SSRs genômicos, distribuídos ao longo dos dez cromossomos do milho. Os marcadores foram avaliados nos genótipos recorrente e doador. Os marcadores polimórficos entre a linhagem recorrente e a linhagem doadora foram utilizados para seleção de plantas com maior taxa de recuperação para o genitor recorrente entre os genótipos L1, L2 e L3 analisados.

Para isso, foram conduzidas reações de PCR com os 100 primers SSR marcados com fluorófos VIC (Verde), 6FAM (Azul) e PET (Vermelho), conforme descrito no apêndice A. Após extração e quantificação, o DNA foi diluído na concentração de 100 ng/μL, e posteriormente submetido às reações em cadeia da polimerase em volume final de 25 uL, contendo 125 ng DNA, 0,2 uM de primers SSR e 23 uL de Platinum PCR SuperMix (Catalog number: 11306152) – ThermoFisher Scientific, que apresenta concentração de 1.1x. (22U/mL complexed recombinant *taq* DNA polymerase with Platinum Taq Antibody, 22 mM Tris-HCL pH 8.4, 55mM KCl, 1.65mM MgCl₂, 220μM dGTP, 220μM dATP, 220μM dTTP, 220μM dCTP).

As reações foram amplificadas em termociclador SimpliAmp (ThermoFisher Scientific), com desnaturação inicial a 95°C por 10min; 45 ciclos de: desnaturação a 94°C por 50 segundos, anelamento (conforme temperaturas especificadas em (apêndice A) dos primers por 50 segundos, e extensão a 72°C por 75 segundos; por fim, foi realizada uma extensão final a 72°C por 20 minutos e as amostras foram mantidas sob baixa temperatura (4 °C) até o momento do preparo das reações para genotipagem.

Para análise da genotipagem, o produto de PCR precisou ser diluído em água ultrapura na proporção 1:100. Após diluição do produto de PCR, foi realizada a montagem da reação para análise da similaridade. A reação foi preparada colocando na placa de 96 poços: 1 μl do DNA diluído na concentração de 1:100, 8,5 μl de Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems™) e 0,3 μL de *size standard* G-600 Liz (Applied Biosystems™). Os fragmentos foram analisados no SeqStudio™ (Applied Biosystems™) de acordo com as seguintes configurações: módulo de corrida (*FragAnalysis*), padrão de tamanho/*size standard* (G-600 Liz) e o conjunto de marcação/ *dye set* (DS-G33).

4.5 Análise dos fragmentos polimórficos

Os dados dos fragmentos amplificados pelos SSRs e analisados no SeqStudio foram exportados para leitura e a determinação dos tamanhos dos fragmentos foi realizada no software GeneMapper (Version 5.0). Durante a análise, foi considerado marcador polimórfico todo aquele que tenha apresentado produtos de amplificação que diferem em número de pares de bases para os dois genitores (doador e recorrente) de cada genótipo em estudo. Os primers polimórficos foram selecionados e, posteriormente, utilizados na avaliação da taxa de recuperação genômica nos indivíduos oriundos de cada umas das linhagens L1, L2 e L3.

4.6 Obtenção da taxa de recuperação do genoma recorrente nas linhagens L1, L2 e L3

Para avaliação da recuperação genômica dos genótipos avaliados, foram conduzidas PCRs convencionais com os marcadores polimórficos previamente selecionados para as linhagens genitoras recorrentes L1, L2 e L3, conforme descrito anteriormente. A reação para análise no SeqStudio™ (Applied Biosystems™) foi conduzida conforme descrito acima para cada uma das amostras de tecido foliar coletadas dos genótipos L1, L2 e L3. Os dados gerados pela análise de fragmentos foram exportados para o software GeneMapper para refinamento e exploração, e os loci amplificados foram avaliados quanto a taxa de recuperação em homozigose (presença do produto amplificado com número de pares de bases referente a um dos genitores) ou heterozigose (presença de dois produtos amplificados com número de pares de bases referentes aos dois genitores).

O cálculo para obtenção da taxa de recuperação individual (RC) de cada planta oriunda das linhagens recorrentes L1, L2, e L3 foi conduzido utilizando a equação (BENCHIMOL, 2005)

$$RC (\%) = [B + (0.5H)/(B + A + H)] \times 100$$

B= Loci recuperados para parental recorrente

A= Loci recuperados para parental doador

H= Loci em heterozigose

4.7 Extração de proteínas para ensaio ELISA

As amostras permaneceram congeladas a -80 °C até o momento do processamento. Para obtenção do extrato de proteínas, foi realizada, primeiramente, a maceração da folha picotada e congelada. A maceração foi feita com a amostra e utensílios congelados em nitrogênio líquido para evitar a desnaturação ou degradação de proteínas. Para obtenção do macerado, foram adicionados em jarros inox os tecidos foliares congelados juntamente com esferas de aço inox de 9,5 mm de diâmetro. Os mesmos foram dispostos nos adaptadores do equipamento TissueLyser II (Qiagen) para maceração. A maceração foi conduzida no equipamento por 2 ciclos de 5 segundos na frequência 30 Hz.

Aos tecidos macerados, foram adicionados 1000 µL de tampão de extração PBST 0,05% com inibidor de protease e PMSF. As amostras foram levadas ao vórtex por 5 minutos na velocidade máxima e posteriormente centrifugadas por 20 minutos a 4.000 rpm. Cerca de 800 µL do sobrenadante foram coletados em novos minitubos e novamente centrifugados a

4.000 rpm por 20 minutos. O extrato proteico obtido após a centrifugação foi utilizado para o ensaio ELISA.

4.8 Quantificação de proteínas por Elisa Competitivo

A quantificação do nível de expressão da proteína foi conduzida pelo método Elisa competitivo, seguindo o protocolo estabelecido pelo fornecedor do kit. A curva-padrão para inferência sobre a concentração proteica na matriz foliar das amostras em estudo foi preparada com padrões conhecidos da proteína-alvo e diluídos no tampão de extração. Os padrões conhecidos foram compostos por dez pontos de concentração, e no momento da montagem da placa, os pontos colocados foram os Standard (Std4 a Std9) de concentrações: 2211,84 ng/mL; 1061,68 ng/mL; 509,61 ng/mL; 244,61 ng/mL; 117,41 ng/mL e 56,36 ng/mL (Tabela 4).

Para o preparo da curva padrão, foram utilizados dez pontos de concentrações proteicas conhecidas, como mostrado na tabela 4. Os pontos Std4, Std5, Std6, Std7, Std8 e Std9 foram selecionados para construção da curva padrão no ensaio de ELISA. A seleção destes pontos foi realizada a partir de dados de recuperação proteica de ensaios anteriores (Dados não mostrados). A taxa de recuperação é geralmente expressa em porcentagem e calculada através da divisão dos valores obtidos pelos valores esperados para cada um dos pontos da curva padrão, vezes 100 (Lipton 2000). Para a L1 e L2 foram preparadas para o ensaio duas curvas padrão e para L3 1 curva padrão, pois o número de plantas analisadas no teste de Elisa para L3 foi menor.

Tabela 4 - Pontos de concentrações para a curva padrão do ensaio Elisa competitivo.

	Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6	Std7	Std8	Std9	Std10
Tampão de Extração (µl)	450	260	260	260	260	260	260	260	260	260
Adicionar	Estoque	Std1	Std2	Std3	Std4	Std5	Std6	Std7	Std8	Std9
Volume p/ adicionar (µl)	50	240	240	240	240	240	240	240	240	240
Concentração final (ng/ml)	20000	9600	4608	2211,84	1061,68	509,61	244,61	117,41	56,36	27,05

Nota: Std (Standard) Fonte: Adaptado do Kit Elisa competitivo.

Após o preparo das amostras e padrões, o ensaio ELISA foi conduzido em microplacas de 96 poços. A placa disponibilizada no kit é previamente imobilizada com anticorpos policlonais específicos para a proteína-alvo. À placa, foram adicionados 100 µL das amostras em triplicata, curva padrão em duplicata, sendo que dois poços, definidos como NSB (non-specific binding), foram reservados para pipetagem de 125 µL de tampão de extração, e dois,

definidos como B0 (máxima ligação), 100 µl do mesmo tampão. Após a pipetagem das amostras, da curva padrão, do NSB e do B0 nos poços da placa, foram pipetados 25 µL da molécula competidora em todos os poços.

A placa foi agitada gentilmente e, posteriormente, incubada por 2 horas, à temperatura ambiente, sob agitação contínua a 150 rpm. Após o período de incubação, o líquido foi aspirado, utilizando Lavadora de Placas WellWash (ThermoFisher), e os poços foram lavados 4 vezes com 300 µL de tampão PBST 0,05%. Após a lavagem, a placa foi vertida em papel toalha para spin invertido na centrífuga por 60 segundos. Posteriormente, foram adicionados 100 µL do substrato TMB em cada poço e, então, a placa foi incubada por 30 minutos no escuro sem agitação. Após incubação, foram adicionados 50 µL da solução stop composta por HCl 1M.

As placas do imunoenensaio ELISA foram lidas na leitora MultiSkan FC, sob comprimento de onda de 450 nm. O coeficiente de regressão logarítmico dos padrões de concentração conhecidos foi calculado utilizando o software Skanlt RE (versão 6.1).

4.9 Análise estatística

As análises dos dados da similaridade foram realizadas com análises gráficas dos segmentos da recuperação do genoma recorrente utilizando o software para visualização de dados genéticos (GGT 2.0). Para o ensaio de imunoabsorção enzimática Elisa os dados de quantificação de proteína alvo foram analisados realizando as médias entre triplicatas, coeficiente de variação (CV), e diagramas de caixa para visualizar a dispersão dos dados das concentrações proteicas das plantas nas diferentes gerações do retrocruzamento.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Marcadores SSR polimórficos selecionados para análise da recuperação do genoma recorrente

Como critério para a seleção dos marcadores, decidiu-se optar por aqueles que apresentassem polimorfismos entre os genitores (doador e recorrente). Assim, foram selecionados 32, 18, e 24 marcadores SSR para as linhagens L1, L2, e L3, respectivamente (Quadro 1). Suas sequências nucleotídicas e nomes estão apresentados no Apêndice A.

Quadro 1 - Seleção de *primers* polimórficos para as linhagens 1, 2 e 3.

Linhagem 1			Linhagem 2			Linhagem 3		
Número Primer	Produto da PCR GR	Produto da PCR GD	Número Primer	Produto da PCR GR	Produto da PCR GD	Número Primer	Produto da PCR GR	Produto da PCR GD
9	288	298	11	135	129	11	136	129
11	123	129	12	138	128	12	139	128
12	138	128	13	120	135	16	81	83
16	95	82	28	331	323	17	249	254
17	251	255	31	320	324	18	118	123
18	118	123	32	274	288	24	145	148
19	152	142	42	133	136	28	332	323
24	144	147	55	197	184	32	275	288
27	154	170	58	201	215	35	116	123
30	128	117	63	167	170	42	124	136
40	189	194	66	76	74	43	213	217
42	130	136	78	140	135	47	155	162
43	213	217	79	146	161	56	94	90
49	134	131	80	124	130	58	205	215
54	147	150	85	290	303	63	167	170
55	195	184	94	137	131	66	76	73
60	252	232	95	145	136	73	131	108
62	71	81	96	101	104	74	96	99
63	166	170				80	124	130
64	219	201				85	292	303
66	88	74				90	120	126
67	132	116				94	137	131
70	225	222				95	145	136
71	298	304				96	101	104
73	100	108						
74	96	99						
87	182	181						
88	98	99						
90	120	126						

94	137	131
95	145	136
99	402	339

Nota: GR (Genitor recorrente), GD (Genitor doador)

Fonte: Do autor (2023).

No trabalho de Mesquita *et al.* (2005), foi avaliada a recuperação do genitor recorrente do milho utilizando 463 *primers* microssatélites, para identificação daqueles polimórficos entre as linhagens genitoras. Na geração RC₁F₁ foram selecionados 27 *primers* polimórficos e na geração RC₂F₁ foram selecionados 41 marcadores. Em estudos semelhantes, Antônio *et al.* (2012) utilizaram marcadores de DNA dos tipos RAPD e microssatélites, onde testaram inicialmente 507 *primers* nos genitores para identificação daqueles polimórficos, selecionando 23 marcas polimórficas. Portanto, as quantidades de marcadores selecionados para as linhagens em estudo neste presente trabalho, estão de acordo com o que vem sendo apresentado em termos de quantidades em trabalhos semelhantes da literatura.

5.2. Taxa de recuperação do genitor recorrente

Em relação à recuperação individual em cada uma das gerações, as três plantas da geração RC4S3 foram selecionadas para as próximas etapas, pois apresentaram recuperação para o genoma recorrente acima do esperado. Em estudos similares, Kostadinović *et al.* (2019) encontraram porcentagem de 99 % de recuperação do genoma do genitor recorrente em indivíduos de geração RC4.

Na geração RC5S2, das quatro plantas analisadas, apenas duas plantas foram selecionadas, pois apresentaram recuperação de 100,00%. Na geração RC6S1, três plantas foram selecionadas, pois, apresentaram taxa de recuperação para o genótipo recorrente de 100 %. Por fim, na geração RC7, apenas uma planta foi selecionada com recuperação de 100% (Tabela5).

Tabela 5 - Contabilização dos loci que voltaram para genitor recorrente (GR) ou genitor doador (GD) de acordo com os marcadores moleculares microssatélites SSR. E cálculo da porcentagem de recuperação obtida para L1.

Geração	Planta	H. GR	HT	H.GD	% RC	% RC Esperada
RC4S3	P1	31	1	0	98.43	
RC4S3	P2	32	0	0	100	96.8750%
RC4S3	P3	32	0	0	100	
RC5S2	P5	32	0	0	100	
RC5S2	P8	30	1	1	95.31	98.4375%
RC5S2	P11	32	0	0	100	

RC5S2	P13	30	1	1	95.31	
RC6S1	P16	31	1	0	98.43	
RC6S1	P17	32	0	0	100	
RC6S1	P18	32	0	0	100	99.2188%
RC6S1	P19	31	1	0	98.43	
RC6S1	P20	32	0	0	100	
RC7	P21	31	0	1	96.87	99.6094%
RC7	P22	32	0	0	100	
Linhagem	P23	32	0	0	100	100,00%

Nota: H.GR: Homozigose genitor recorrente HT: Heterozigose H.GD: Homozigose genitor doador
%RC: Porcentagem de recuperação %RC esperada: Porcentagem de recuperação esperada.

Fonte: Do autor (2023).

Na recuperação individual, as duas plantas da geração RC3S5 não foram selecionadas para as próximas etapas, pois, apresentaram porcentagem de recuperação abaixo da esperada. De acordo com os resultados observados por Kostadinovic et al (2019), foi também observado que 52% dos indivíduos apresentaram recuperação inferior, provavelmente em função do fato de apresentarem locos de recuperação para o genitor doador.

Na geração RC6S1, apenas duas plantas foram selecionadas, por apresentarem 100.00% de recuperação do genoma recorrente e, oito plantas não foram selecionadas, pois apresentaram locos de recuperação para o genitor doador ou locos em heterozigose. Nas gerações RC5S2 e RC7 não houve seleção (Tabela 6).

Tabela 6 - Contabilização dos loci que voltaram para genitor recorrente (GR) ou genitor doador (GD) de acordo com os marcadores moleculares microssatélites SSR. E cálculo da porcentagem de recuperação obtida e esperada para cada planta na L2.

Geração	Planta	H. GR	HT	H.GD	% RC	%RC ESPERADA
RC3S5	P1	14	0	4	77,77	93,75%
RC3S5	P2	14	1	3	80,55	
RC5S2	P14	15	1	2	86,11	98,44%
RC5S2	P16	15	1	2	86,11	
RC6S1	P4	17	1	0	97,22	99,22%
RC6S1	P6	17	1	0	97,22	
RC6S1	P8	18	0	0	100	
RC6S1	P9	16	2	0	94,44	
RC6S1	P10	16	1	1	91,66	
RC6S1	P11	14	2	2	83,33	
RC6S1	P12	16	1	1	91,66	
RC6S1	P13	15	1	2	86,11	
RC6S1	P17	18	0	0	100	
RC6S1	P19	14	0	4	77,77	

RC7	P20	15	3	0	91,66	99,61%
Linhagem	P21	18	0	0	100	100,00%

Nota: H.GR: Homozigose genitor recorrente HT: Heterozigose H.GD: Homozigose genitor doador
%RC: Porcentagem de recuperação %RC esperada: Porcentagem de recuperação esperada.

Fonte: Do autor 2023.

Todas as quatro plantas da geração RC3S5 foram selecionados para as próximas etapas de análise, pois apresentaram recuperação do genoma recorrente acima da taxa esperada nessa geração. A planta da geração RC5S1 foi selecionada com 100.00% de recuperação. Já na geração RC4S2 não houve seleção de plantas, pois, a recuperação ficou abaixo da expectativa teórica (Tabela 7).

Em estudos similares, Kostadinović et al. (2019) encontraram porcentagem de 99 % de recuperação do genoma do genitor recorrente em indivíduos de geração RC4. Resultados similares de Silva (2019) demonstraram que, na cultura da soja, utilizando o método KASP para identificação de indivíduos que apresentem maior proporção de recuperação do genoma recorrente, foi observada recuperação para o genótipo recorrente acima da média esperada já em indivíduos da geração RC2F1.

Tabela 7. Contabilização dos loci que voltaram para genitor recorrente (GR) ou genitor doador (GD) de acordo com os marcadores moleculares microssatélites SSR. E cálculo da porcentagem de recuperação obtida e esperada para cada planta da L3.

Geração	Planta	H. GR	HT	H.GD	% RC	%RC Esperada
RC3S5	P1	24	0	0	100	93.75%
RC3S5	P2	24	0	0	100	
RC3S5	P4	24	0	0	100	
RC3S5	P7	24	0	0	100	
RC4S2	P10	19	5	0	89.58	96,875%
RC5S1	P9	24	0	0	100	98,438%
Linhagem	P13	24	0	0	100	100.00%

Nota: H.GR: Homozigose genitor recorrente HT: Heterozigose H.GD: Homozigose genitor doador
%RC: Porcentagem de recuperação %RC esperada: Porcentagem de recuperação esperada.

Fonte: Do autor (2023).

Souza (2021) desenvolveu um estudo analisando a influência da distância entre genitores na recuperação do parental recorrente na conversão de linhagens de milho e avaliaram a recuperação do genitor recorrente usando o marcador molecular SNP nas gerações RC1, RC2 e RC3. As plantas apresentaram elevada taxa de recuperação para o genitor recorrente em todas as gerações avaliadas.

Os resultados obtidos com a aplicação dos marcadores SSR durante o programa de retrocruzamento do milho estão coerentes com os resultados encontrados na literatura, como

foi mostrado em estudos realizados por Silva (2019) e Souza (2021). Com a aplicabilidade dos marcadores moleculares SSR, foi possível alcançar ganhos importantes na recuperação do genitor recorrente durante as gerações entre as linhagens analisadas.

5.3. Análise gráfica da distribuição cromossômica e locus recuperados para o genitor recorrente

Os marcadores polimórficos selecionados para análise da população da L1 estão distribuídos nos cromossomos 1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, e 10. Como mostrado na Figura 2, os fragmentos de coloração azul são os locos recuperados para o genitor recorrente, enquanto aqueles sob coloração amarela são os locos em heterozigose; em coloração vermelha, estão os locos em homozigose para o genitor doador.

Como apresentado na tabela 5, das 15 plantas avaliadas, dez apresentaram recuperação do genoma do genitor recorrente, acima do esperado na geração analisada, sendo uma delas a própria linhagem recorrente para confirmação da eficiência da análise.

Através da visualização gráfica, é possível observar claramente em quais cromossomos os indivíduos apresentaram variações de fragmentos em homozigose e heterozigose.

Deste modo, para a L1 foram selecionadas dez plantas, sendo uma delas a própria linhagem, que apresentaram 100% de recuperação do genoma do genitor recorrente. A planta 1, apesar de apresentar loci em heterozigose, apresentou taxa de recuperação acima da porcentagem esperada para a geração de retrocruzamento (RC) em que se encontra e, por isso, também foi selecionada (Tabela 8).

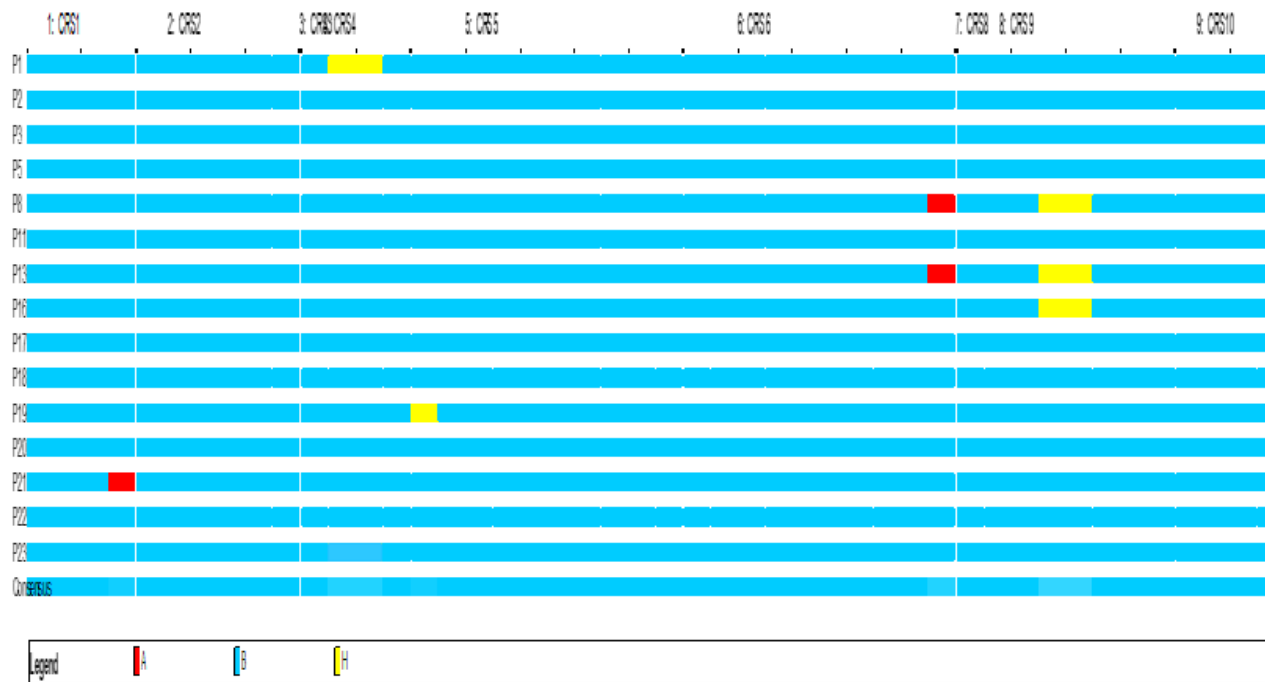
Das 16 plantas avaliadas da L2, apenas três apresentaram 100% de recuperação do genoma do genitor recorrente, sendo uma delas a própria linhagem recorrente para confirmação da eficiência da análise (Tabela 6). Através da visualização gráfica (Figura 3), é possível observar claramente em quais cromossomos os indivíduos apresentaram variações de fragmentos em homozigose e heterozigose.

As outras treze plantas analisadas apresentaram loci em heterozigose ou homozigose para o genitor doador, o que fez cair a taxa de recuperação do genoma recorrente. Deste modo, para a L2 foram selecionadas três plantas (Tabela 8).

Para a L3 dentre as sete plantas avaliadas, seis apresentaram 100% de recuperação do genoma do genitor recorrente, sendo uma delas a própria linhagem recorrente para confirmação da eficiência da análise (Tabela 7). Através da visualização gráfica (Figura 4) é

possível observar claramente que, nos cromossomos (1, 2, 3, 5, 6, 7, 9 e 10) os indivíduos apresentaram variações de fragmentos em homozigose e heterozigose.

Figura 2 - Análise gráfica dos segmentos da recuperação do genoma recorrente nos 15 indivíduos derivados da linhagem 1.



A: segmento do genoma em homozigose para o genitor doador; B: segmento do genoma em homozigose para o genitor recorrente; e H: segmento do genoma em heterozigose.

Fonte: Software GGT

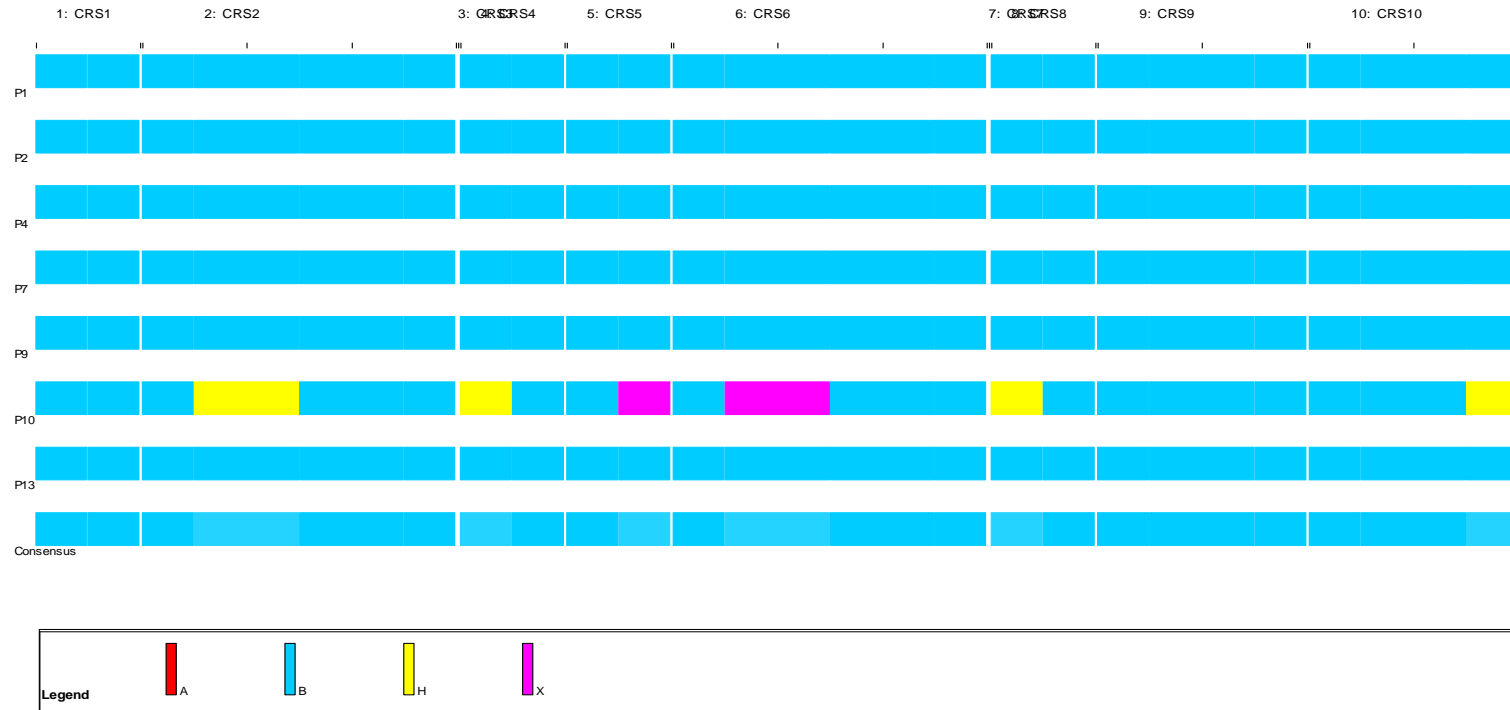
Figura 3 - Análise gráfica dos segmentos da recuperação do genoma recorrente nos 16 indivíduos derivados da linhagem 2.



A: segmentos do genoma em homocigose para o genitor doador; B: segmentos do genoma em homocigose para o genitor recorrente; e H: segmentos do genoma em heterocigose.

Fonte: Software GGT 2.0.

Figura 4 - Análise gráfica dos segmentos da recuperação do genoma recorrente nos 7 indivíduos derivados da linhagem 3.



A: segmentos do genoma em homozigose para o genitor doador; B: segmentos do genoma em homozigose para o genitor recorrente; H: segmentos do genoma em heterozigose; e X: dados perdidos.

Fonte: Software GGT 2.0

A planta 10 apresentou loci em heterozigose, o que fez cair a taxa de recuperação do genoma recorrente e, por isso, ela não foi selecionada. Dessa forma, para L3 foram selecionadas seis plantas para as próximas análises (Tabela 8).

A análise gráfica para visualização dos segmentos em homozigose para genitor recorrente ou doador, ou segmentos que apresentem loci em heterozigose, podem ser apresentados em leituras gráficas, como foi realizado no presente trabalho, e também no estudo de Miah *et al* (2015), que analisou a recuperação do genoma recorrente em um programa de retrocruzamento de arroz utilizando marcadores SSR.

Estes autores observaram que nos cromossomos 1, 8 e 11 foram recuperados o genótipo recorrente para todas as linhagens. Outro estudo que demonstra a leitura gráfica dos cromossomos em segmentos como do presente trabalho, é o estudo de Mallick (2022), que também trabalhou com marcadores microssatélites.

Mallick (2022), observou na apresentação gráfica a recuperação do parental recorrente na maioria dos cromossomos. No entanto, como foi visualizado no presente trabalho, o autor também visualizou em alguns cromossomos segmentos de resíduos do parental doador.

Os resultados de similaridade alcançados com a aplicação dos marcadores SSR durante o programa de retrocruzamento do milho estão coerentes com os resultados encontrados na literatura, como mostra Silva (2019), que analisou a recuperação do genoma recorrente em diferentes gerações do retrocruzamento, como RC1F1 e RC2F1.

Com a aplicabilidade dos marcadores moleculares SNPs e o mesmo princípio do presente trabalho de avaliar a taxa de recuperação do genoma recorrente em estágios de retrocruzamento, foi possível obter ganhos importantes em termos de recuperação do genitor recorrente, gerando alcance da média de recuperação para indivíduos de 75,81% em RC1F1 e de 93,86% na RC2F1, sendo a média teórica de 75 e 87,50 %, respectivamente.

Destaque para a referência de Souza (2021), de que mesmo com alcance de 99% de similaridade genética do genótipo do genitor recorrente, deve-se considerar a existência de divergência entre plantas no processo de retrocruzamento e o genitor recorrente, uma vez que 1% do genoma do milho pode conter vários genes.

As análises de similaridade possibilitaram selecionar indivíduos cuja recuperação do genótipo recorrente foi igual ou superior à esperada. Os mesmos foram submetidos ao ensaio enzimático Elisa competitivo para verificação da expressão proteica da proteína alvo. Por meio disso, os indivíduos oriundos das linhagens L1, L2 e L3 selecionados para o imunoensaio estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8 - Seleção de plantas oriundas da L1, L2, e L3 para realização do teste de Elisa.

Seleção de Plantas na L1, L2 e L3				
Linhagem	Planta	Geração	% Recuperação Obtida	% Recuperação Esperada
L1	P1	RC4S3	98,43	
	P2	RC4S3	100	96,87%
	P3	RC4S3	100	
	P5	RC5S2	100	98,43%
	P11	RC5S2	100	
	P17	RC6S1	100	
	P18	RC6S1	100	99,21%
	P20	RC6S1	100	
	P22	RC7	100	99,60%
	P23	Linhagem	100	100%
L2	P8	RC6S1	100	99,22%
	P17	RC6S1	100	
	P21	Linhagem	100	100%
L3	P1	RC3S5	100	
	P2	RC3S5	100	93,75%
	P4	RC3S5	100	
	P7	RC3S5	100	
	P9	RC5S1	100	98,44%
	P13	Linhagem	100	100%

Fonte: Do autor (2023).

5.4 Ensaio de imun absorção enzimática (ELISA)

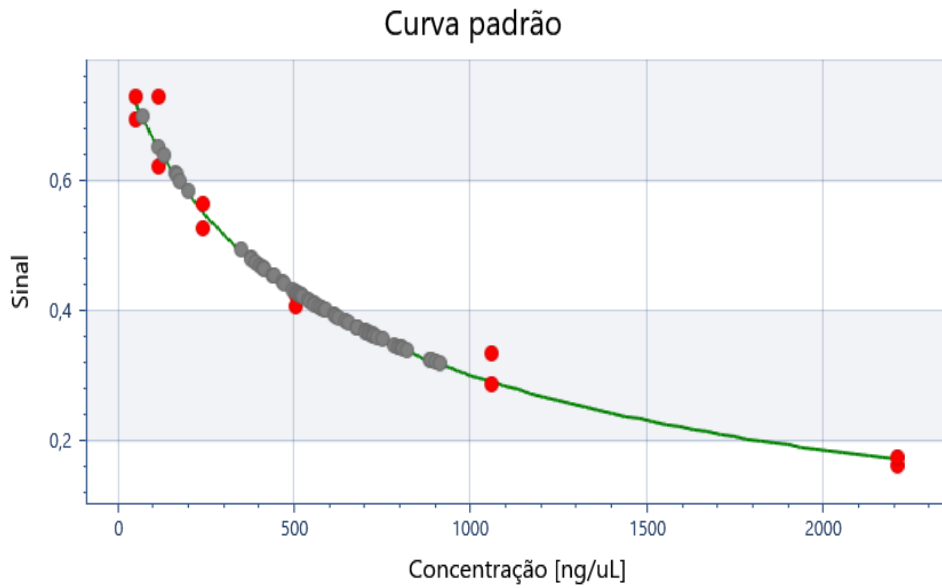
5.4.1 Curvas e padrão do ensaio

5.4.1.1 Curvas e padrões para as três linhagens (L1, L2 e L3)

Os valores de regressão linear das curvas padrão das primeiras placas da linhagem 1 (L1) foram R^2 : 0,995 e R^2 : 1 (Figura 5 e 6). A primeira curva da L2 ficou com R^2 de 0,999 e a segunda curva ficou com R^2 : 0,995 (figura 7 e 8). A L3 apresentou R^2 de 0,989 (figura 9). Para cada uma das curvas, é esperado um R^2 entre 0,98 a 1. Assim, os resultados obtidos nessas placas foram validados e utilizados no ensaio.

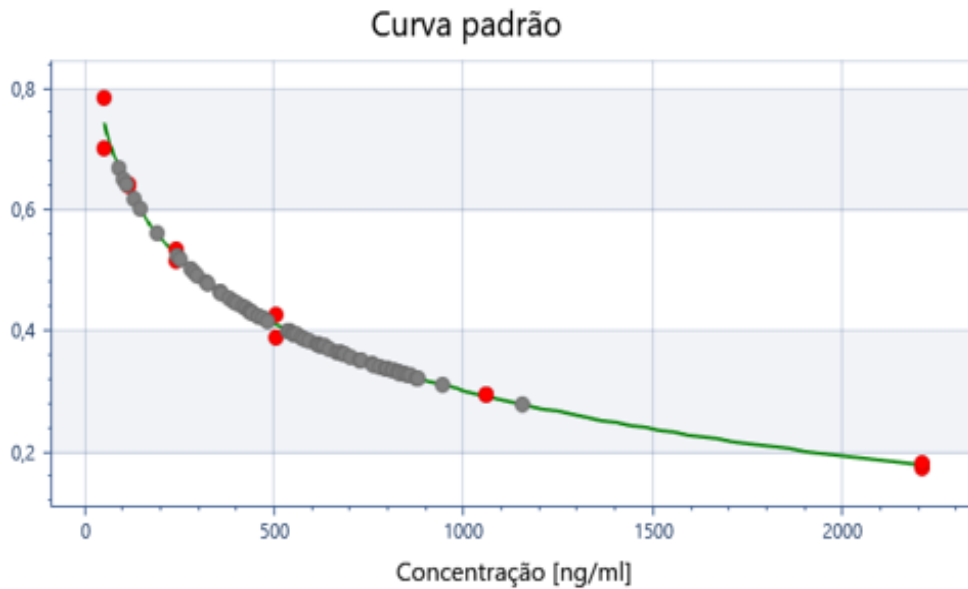
Em concordância com estudos de Nix e Wild (2001) o valor de R^2 indica a qualidade do ajuste linear da curva padrão e valores de $R^2 > 0,99$ são considerados um ajuste ideal. Em resultados semelhantes apresentados por Possa (2012), foram realizados 10 ensaios imunoenzimáticos e para as 10 curvas padrão foram obtidas, R^2 acima de 0,99%.

Figura 5 - Curva padrão obtida para o ensaio da placa 1 da linhagem.



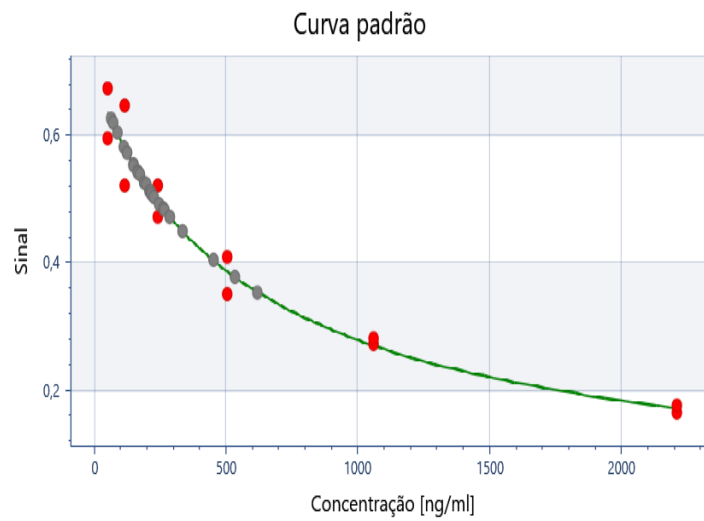
Nota: Os pontos em vermelho são os Standards, pontos em cinza são as amostras do ensaio.
Fonte: Do autor (2023).

Figura 6 - Curva padrão obtida da placa 2 do ensaio para linhagem 1.



Nota: Os pontos em vermelho são os Standards, pontos em cinza são as amostras do ensaio.
Fonte: Do autor (2023).

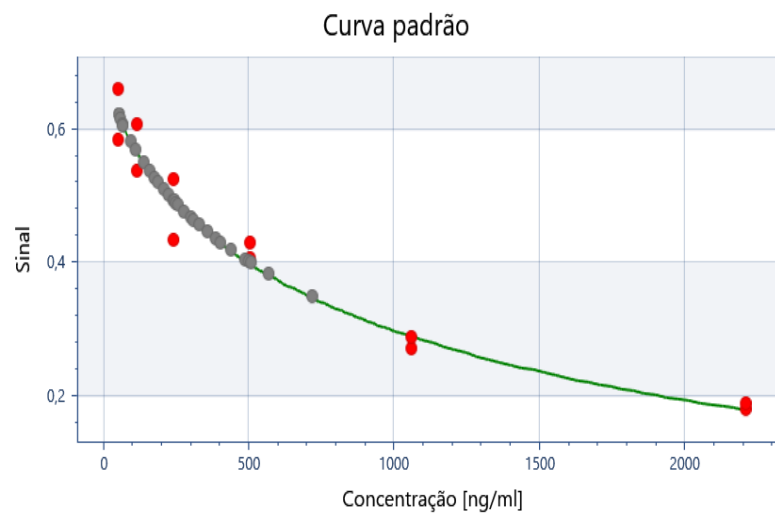
Figura 7 - Curva padrão obtida para o ensaio da placa 1 da linhagem 2.



Nota: Os pontos em vermelho são os Standards, pontos em cinza são as amostras do ensaio.

Fonte: Do autor (2023).

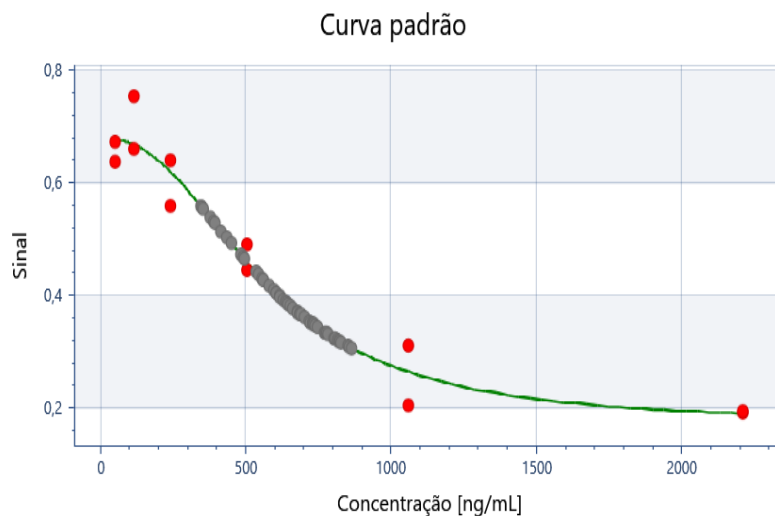
Figura 8 - Curva padrão obtida para o ensaio da placa 2 da linhagem 2.



Nota: Os pontos em vermelho são os Standards, pontos em cinza são as amostras do ensaio.

Fonte: Do autor (2023).

Figura 9 - Curva padrão obtida para o ensaio da placa 1 da linhagem 3.



Nota: Os pontos em vermelho são os Standards, pontos em cinza são as amostras do ensaio.

Fonte: Do autor (2023).

Em estudos de Han (2019) foi desenvolvido o mesmo teste Elisa que foi realizado no presente trabalho. No caso específico, foi feito um Ensaio imunoenzimático competitivo com o intuito de detectar desoxinivalenol (DON) em alimentos e grãos para ração, avaliando tanto a farinha do milho quanto o próprio milho. Neste experimento também foi avaliado o valor de R^2 da curva, obtendo-se o valor de 0,972.

Em outros trabalhos publicados na literatura como a de Fausto (2010), onde o ensaio Elisa é aplicado para determinação da concentração proteica, realiza-se a conferência dos valores alcançados na regressão linear das curvas padrão desenvolvidas, pois, de acordo com o autor, valores de R^2 proporcionam uma correlação entre os dados.

Em outros estudos, como o desenvolvido por Zhang (2019), foi também realizado um imunoensaio para detecção, de carbofurano, um inseticida utilizado em várias culturas agrícolas para encurtar o período de crescimento e aumentar o rendimento das culturas em vegetais e amostras de frutas. Contudo, dada sua toxicidade, foram necessários ensaios rápidos como o Elisa para detectá-lo.

E para respostas confiáveis, é importante que a qualidade do R^2 seja avaliada. Nestes casos, o coeficiente de correlação obtido foi de 0,9913. O Elisa competitivo, que foi

desenvolvido no trabalho, foi considerado rápido e simples na detecção do carbofurano em culturas agrícolas.

Além da verificação do R^2 das curvas padrão, também foram realizados os cálculos dos coeficientes de variação das absorbâncias entre as réplicas técnicas de cada ponto. A primeira e segunda placa do ensaio para a L1, e todos os standards Std4 a Std9 apresentaram porcentagem de variação esperadas, entre 70 e 120 % (Tabela 9).

Os pontos Std4 a Std7 da primeira placa da L2 apresentaram porcentagens de variação esperadas; na segunda placa seis pontos Std4 a Std9 apresentaram variações entre 70 e 120% (Tabela 10). Os pontos Std4 a Std8 na L3 apresentaram variações dentro do intervalo esperado, de 70 a 120 % (Tabela 11). Em concordância com Lipton (2000), valores médios de recuperação entre 70 e 120 % são idealmente utilizados.

Tabela 9 - Análise da variação dos pontos St4 a Std9 das placas 1 e 2 da linhagem 1.

Curva Padrão Placa 1 e 2 – L1						
	Tipo	Amostra	Sinal	Conc. [ng/mL]	Conc. Teórico	Var %
Placa 1	Padrão	STD4	0.1657	2.196	2.211.840	101%
	Padrão	STD5	0.3075	979.65	1.061.68	108%
	Padrão	STD6	0.4138	547.3	5.09.608	93%
	Padrão	STD7	0.5448	259.8	244.610	94%
	Padrão	STD8	0.6742	153.7	117.414	76%
	Padrão	STD9	0.7100	79.24	56.360	71%
	Padrão	STD4	0.1763	2151	2.211.840	103%
	Padrão	STD5	0.2933	1.048	1.061.68	101%
	Placa 2	Padrão	STD6	0.4063	518.2	509.608
Padrão		STD7	0.5223	247.0	244.610	99%
Padrão		STD8	0.6378	115.2	117.414	102%
Padrão		STD9	0.7411	76.35	56.360	74%

Nota: Conc: Concentração Var %: Porcentagem de Variação.

Fonte: Do autor (2023).

Tabela 10 - Análise da variação dos pontos St4 a Std9 das placas 1 e 2 da linhagem 2.

Curva Padrão Placa 1 e 2 – L2						
	Tipo	Amostra	Sinal	Conc. [ng/mL]	Conc. Teórico	Var %
Placa 1	Padrão	STD4	0,1686	2137	2.211,84	104%
	Padrão	STD5	0,275	1.019,2	1.061,68	104%
	Padrão	STD6	0,3779	539,6	509,608	94%
	Padrão	STD7	0,4953	245,5	244,61	100%
	Padrão	STD8	0,5833	199,6	117,414	59%

	Padrão	STD9	0,633	154,1	101,3	66%
	Padrão	STD4	0,1819	2.111	2.211,84	105%
	Padrão	STD5	0,2781	1.147,5	1.061,68	93%
Placa 2	Padrão	STD6	0,4169	444,9	509,608	115%
	Padrão	STD7	0,4768	292,2	244,61	84%
	Padrão	STD8	0,5715	116,2	117,414	101%
	Padrão	STD9	0,6209	96,76	101,3	105%

Nota: Conc: Concentração Var %: Porcentagem de Variação.

Fonte: Do autor (2023)

Tabela 11 - Análise de variação entre os pontos do ensaio da placa 1 para L3.

Curva Placa 1 – L3					
Tipo	Amostra	Sinal	Conc. [ng/mL]	Conc. Teórico	Var %
Padrão	STD4	0.1916	2068.5	2.211.84	107%
Padrão	STD5	0.2561	1279.3	1.061.68	83%
Padrão	STD6	0.4668	494.8	509.608	103%
Padrão	STD7	0.5981	266.2	244.610	92%
Padrão	STD8	0.7052	149.6	117.414	78%
Padrão	STD9	0.6533	154.10	56.360	37%

Nota: Conc: Concentração Var %: Porcentagem de Variação.

Fonte: Do autor (2023)

5.4.1.2 Coeficiente de variação das amostras das linhagens (L1, L2 e L3)

O coeficiente de variação foi obtido dividindo o desvio padrão (DP) pelo valor da média multiplicado por 100 ($CV = DP/Média \times 100$). Todas as vinte e três plantas oriundas da linhagem 1 para o teste de Elisa, apresentaram coeficientes de variação inferiores a 20%

Dentre as vinte e uma plantas oriundas da L2, onze apresentaram coeficientes de variação inferiores a 20%. As treze plantas oriundas da L3 apresentaram %CV das amostras inferiores a 20% (Tabela 12).

Para todas as amostras correspondentes às três linhagens (L1, L2 e L3) foi avaliado o coeficiente de variação padrão (% CV), pois, valores inferiores a 20% indicam baixa ou ausência de interferências no ensaio, tais como pipetagens das três réplicas técnicas das amostras na placa do ensaio (ALBRIGHT; HELLMICH; COATS, 2016). Nos estudos de Singh *et al* (2019) com Elisa competitivo para detecção de citrinina em amostras de farinha de milho e trigo, os autores também consideraram valores inferiores a 20% para coeficiente de variação das amostras.

Em estudos com análise do mesmo imunoensaio, o competitivo, também foram analisados os valores de CV para as amostras. Foi observado nos estudos de Wu (2017), que o

coeficiente de variação ficou entre 5,6 a 14,5%, sendo adotado pelo autor o padrão aceitável de valores inferiores a 15%.

Outro estudo com aplicabilidade do Elisa competitivo foi desenvolvido por Cui et al. (2022) para detecção quantitativa de Enterobacteriaceae. O coeficiente de variação dos ensaios ficou entre 4,00 e 12,3 %, o que indica alta precisão, repetibilidade e reprodutibilidade do ensaio desenvolvido.

Tabela 12 - Análise do coeficiente de variação (CV) das amostras oriundas das linhagens L1, L2 e L3.

L1		L2		L3	
Planta	CV	Planta	CV	Planta	CV
P1	8%	P1	< Mín.	P1	13%
P2	5%	P2	< Mín.	P2	7%
P3	12%	P3	< Mín.	P3	5%
P4	6%	P4	5%	P4	11%
P5	7%	P5	3%	P5	14%
P6	4%	P6	8%	P6	11%
P7	5%	P7	8%	P7	17%
P8	3%	P8	< Mín.	P8	5%
P9	3%	P9	< Mín.	P9	11%
P10	2%	P10	< Mín.	P10	2%
P11	5%	P11	< Mín.	P11	3%
P12	8%	P12	12%	P12	2%
P13	11%	P13	< Mín.	P13	< Mín.
P14	3%	P14	5%		
P15	7%	P15	8%		
P16	10%	P16	3%		
P17	4%	P17	3%		
P18	4%	P18	9%		
P19	4%	P19	< Mín.		
P20	6%	P20	6%		
P21	5%	P21	< Mín.		
P22	4%				
P23	3%				

Nota: <Min. São as amostras que não foram detectadas concentração proteica, por isso não foi possível calcular o CV.

Fonte: Do autor (2023)

6 CONVERSÃO

As placas correspondentes ao ensaio imunoenzimático foram lidas na leitora MultiSkan FC, software Skanlt RE (versão 6.1). No programa, foi realizada a conversão dos dados de absorvância em proteínas. Os dados de concentração proteica foram expressos no programa em ng/ul e, posteriormente, foi realizada a conversão em nanogramas de proteínas por grama de tecido fresco (ngCry/gFT), levando sempre em consideração o valor de (gFT), que foi de 125mg.

Das 23 plantas oriundas da L1, quatro plantas da geração RC4S3 apresentaram concentrações proteicas que variaram entre 4.082.133 a 4.601.867 ng/g. Onze plantas da geração RC5S2 apresentaram concentrações proteicas entre 2686.667 a 6625, 867ng/g. Os cinco indivíduos da geração RC6S1 apresentaram concentrações proteicas que variaram entre 1943.467 a 7499.467ng/g, e as duas plantas correspondentes ao retrocruzamento RC7 apresentaram concentrações proteicas de 3602.667 e 3830,4 ng/g (Tabela 13).

Das vinte e uma plantas oriundas da L2, três da geração RC3S5 não apresentaram concentrações proteicas no ensaio. As três plantas da geração RC5S2, apresentaram concentrações de proteína entre 1050,213 e 1977,6 ng/g. Das treze plantas em RC6S1, em seis não foram detectadas proteínas, e as sete que apresentaram a concentração proteica ficou entre 458,28 e 3021,067ng/g, e uma em RC7, apresentou concentração de proteica de 1375,467 ng/g (Tabela 14). Para as treze plantas analisadas na L3, oito plantas da geração RC3S5 apresentaram concentrações proteicas entre, 5384 a 6155,467ng/g. Na geração RC4S2 a concentração de proteína ficou entre 5633,6 a 6678,133 ng/g (tabela 15).

A partir destes resultados para as plantas da L1 e L3, percebe-se que, as concentrações proteicas se mantiveram entre diferentes gerações de retrocruzamentos e gerações de autofecundações. Para as amostras analisadas na L2, a detecção proteica foi ineficiente para muitas plantas e foi observada oscilação da concentração proteica entre diferentes gerações.

Os resultados possibilitaram concluir também que entre as plantas selecionadas na similaridade na L1 para fazer o teste de Elisa, apenas a planta P20 apresentou baixa expressão da proteína, quando comparada com os resultados da expressão proteica das outras plantas oriundas da mesma linhagem. As duas plantas selecionadas na L2 no teste de genotipagem apresentaram baixa expressão proteica no Elisa. As plantas selecionadas na L3 no teste de genotipagem apresentaram alta expressão proteica, o que foi coerente com os resultados da similaridade, pois elas apresentaram recuperação do genoma recorrente acima do valor teórico esperado de recuperação.

Os imunoenaios são aplicados em várias etapas do desenvolvimento do material transgênico e algumas dessas etapas são: Transformação genética, Retrocruzamento, Desenvolvimento do híbrido, Produção, vendas e suporte até a aquisição do cliente (Bandla *et al* 2006).

Tabela 13 - Análise da média da concentração de proteína e desvio padrão nas gerações do retrocruzamento nas amostras oriundas da linhagem 1 (L1).

Conversão			
Planta	Geração	Média (ng/g)	DP
P1	RC4S3	4.082,13	741,77
P2	RC4S3	4.601,86	533,08
P3	RC4S3	4.580	1224,00
P4	RC4S3	4.203,20	567,43
P5	RC5S2	3.657,20	588,87
P6	RC5S2	5.928,20	410,76
P7	RC5S2	5845,06	599,54
P8	RC5S2	5.160	402,71
P9	RC5S2	4.631,73	343,70
P10	RC5S2	6.270,13	240,22
P11	RC5S2	6.330,4	598,66
P12	RC5S2	2.686,67	662,40
P13	RC5S2	3.262,13	992,78
P14	RC5S2	6.625,86	377,44
P15	RC5S2	6.453,86	883,62
P16	RC6S1	7.499,46	1557,45
P17	RC6S1	5.065,33	428,41
P18	RC6S1	6.971,73	608,89
P19	RC6S1	3.956	456,18
P20	RC6S1	1.943,46	357,04
P21	RC7	3.830,4	504,57
P22	RC7	3.602,66	364,99
P23	L	1287,73	191,12

Nota: DP: Desvio Padrão.

Fonte: Do autor (2023).

Tabela 14 - Análise da média da concentração de proteína e desvio padrão nas gerações do retrocruzamento nas amostras oriundas da linhagem 2 (L2).

Conversão			
Planta	Geração	Média	DP
P1	RC3S5	0	0
P2	RC3S5	0	0
P3	RC3S5	0	0
P4	RC6S1	2.341,86	479,23
P5	RC6S1	3.021,06	321,57
P6	RC6S1	3.000,8	788,56
P7	RC6S1	2.019,2	698,05
P8	RC6S1	0	0
P9	RC6S1	0	0
P10	RC6S1	0	0
P11	RC6S1	0	0
P12	RC6S1	4.58,28	6,2791
P13	RC6S1	0	0
P14	RC5S2	1.754,8	35,638
P15	RC5S2	1.050,21	483,82
P16	RC5S2	1.977,6	190,13
P17	RC6S1	1.982,66	673,68
P18	RC6S1	2.011,46	224,34
P19	RC6S1	0	0
P20	RC7	1.375,46	385,51
P21	L	0	0

Nota: DP: Desvio Padrão.

Fonte: Do autor (2023).

Tabela 15 - Análise da média da concentração de proteína e desvio padrão nas gerações do retrocruzamento nas amostras oriundas da linhagem 3 (L3).

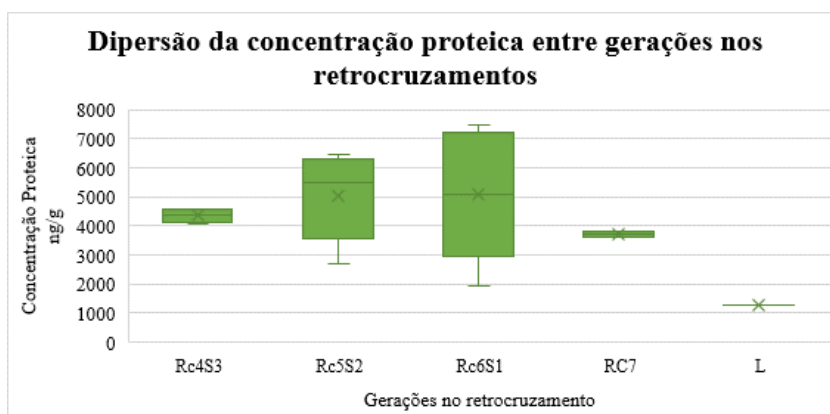
Conversão			
Planta	Geração	Média (ng/g)	DP
P1	RC3S5	5.413,06	869,56
P2	RC3S5	6.080,8	506,56
P3	RC3S5	6.155,46	344,41
P4	RC3S5	5.510,93	711,29
P5	RC3S5	5384	935,60
P6	RC3S5	5.648,26	858,80
P7	RC3S5	5.395,6	342,23
P8	RC3S5	5.539,46	328,82
P9	RC5S1	4.380,53	759,32
P10	RC4S2	6.823,2	151,10
P11	RC4S2	5.633,6	224,47
P12	RC4S2	6.678,13	166,66
P13	L	2816,4	2.8284

Nota: DP: Desvio Padrão.

Fonte: Do autor (2023).

A figura 10 mostra a dispersão dos dados, em ngCry/gFT, dos indivíduos oriundos da linhagem L1. O gráfico mostra que, para esta linhagem, não há variação expressiva da concentração de proteína entre os diferentes retrocruzamentos. A linhagem convencional também foi avaliada, pois, segundo dados prévios, é possível que a matriz da amostra apresente sinal na leitura do ensaio, causando ruído na análise final. Assim, os dados dos retrocruzamentos só foram considerados positivos se superiores ao encontrado no sinal da linhagem convencional.

Figura 10 - Análise proteica em ng/g nas diferentes gerações do retrocruzamento para as plantas oriundas da Linhagem 1.



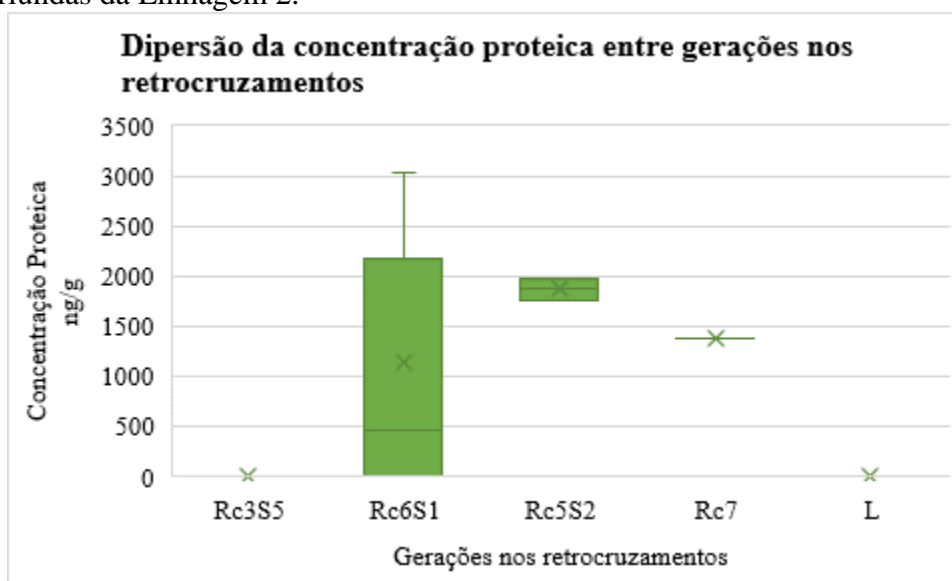
Fonte: Elaborado por Almeida (2023).

A figura 11 mostra a dispersão dos dados, em ngCry/gFT, da linhagem L2. O gráfico mostra que para esta linhagem ocorreu uma variação expressiva da concentração de proteína entre os indivíduos do retrocruzamento RC6S1. Além disso, observa-se que, os indivíduos da geração RC3S5 não apresentaram quantificação proteica.

Assim, para a linhagem 2 foi observada baixa expressão de proteína em várias plantas, o que foi passado ao gerente do programa de melhoramento da empresa Helix Sementes e Biotecnologia Ltda, para tomada de decisões levando em conta estes resultados, bem como a realização de outros testes. Por esse motivo, a linhagem não seguiu para outras etapas dentro do programa de melhoramento.

Não são considerados positivos os resultados onde as concentrações proteicas são baixas, pois, para uma proteína inseticida estar presente no material, a mesma necessariamente deve estar expressa em elevadas concentrações (STEVE, 2002).

Figura 11 - Análise proteica em ng/g nas diferentes gerações do retrocruzamento para as plantas oriundas da Linhagem 2.

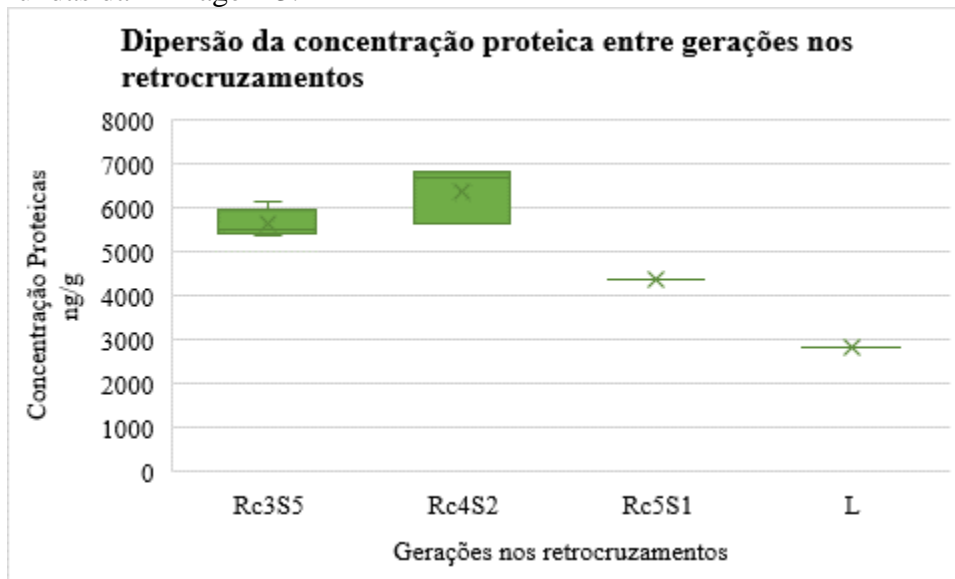


Fonte: Elaborado por Almeida (2023).

A figura 12 mostra a dispersão dos dados, em ngCry/gFT, das amostras oriundas da linhagem L3. O gráfico mostra que, para os indivíduos desta linhagem não há variação expressiva da concentração de proteína entre os diferentes retrocruzamentos.

A linhagem convencional também foi avaliada, pois, segundo dados prévios, é possível que a matriz da amostra apresente sinal na leitura do ensaio, causando ruído na análise final. Assim, os dados dos retrocruzamentos só foram considerados positivos se superiores ao encontrado no sinal da linhagem convencional.

Figura 12 - Análise proteica em ng/g nas diferentes gerações do retrocruzamento para as plantas oriundas da Linhagem 3.



Fonte: Elaborado por Almeida (2023).

O ensaio Elisa competitivo para análise das concentrações proteicas foi eficiente neste trabalho para mostrar a presença ou ausência da proteína de interesse nas amostras analisadas das diferentes gerações de retrocruzamentos de autofecundações. De acordo com estudos de Faheem *et al* (2021), avanços nos imunoenaios estão como propostas futuras para detecção de toxinas Cristalinas de *Bacillus thuringiensis*.

Os autores comentam que um dos avanços no Elisa competitivo será a aplicação de anticorpos biotinizados e antígenos acoplados a esferas, sendo que com este avanço será possível detectar várias toxinas de uma só vez.

Avanços nos imunoenaios serão eficazes para auxiliar nas explicações aprofundadas, ou análises mais precisas de plantas que apresentam resultados de concentrações proteicas abaixo da expectativa, como foi observado para algumas plantas oriundas da L2.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos no trabalho pôde-se observar que o teste de similaridade é uma ferramenta molecular confiável para auxiliar na seleção de plantas que apresentem porcentagem de recuperação esperada do genótipo do genitor recorrente dentro da geração analisada, além de ser viável para seleção de genótipos com taxa de conversão acima da esperada. O ensaio imunoenzimático Elisa para a detecção de proteína alvo é uma análise importante para auxiliar nos retrocruzamentos em um programa de melhoramento genético, pois determina a quantidade da proteína de interesse em cada uma das gerações analisadas. Além disso, é possível identificar em quais gerações ou quais genótipos apresentam baixa concentração proteica como foi o caso da L2, a detecção proteica foi ineficiente e foi observada oscilação da concentração proteica entre diferentes estágios de conversão. As duas técnicas moleculares juntas podem auxiliar o programa de melhoramento de plantas transgênicas, trazendo agilidade e confiabilidade ao processo.

REFERÊNCIAS

ANTONIO, Rafaela Priscila *et al.* SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES DE DNA EM RETROCRUZAMENTO VISANDO RESISTÊNCIA AO MOFO BRANCO EM FEIJOEIRO. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 25, n. 4, p. 61-67, dez. 2012. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=237125883008>.

ALBRIGHT, Vurtice C.; HELLMICH, Richard L.; COATS, Joel R.. A Review of Cry Protein Detection with Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 64, n. 11, p. 2175-2189, 15 mar. 2016. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03766>.

BERNARDELI, Arthur Martins Almeida. **VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES SNP PARA ALTO CONTEÚDO DE PROTEÍNA EM GRÃOS DE SOJA [Glycine max (L.) Merr.]**. 2019. 39 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2019.

BENCHIMOL, Luciana Lasry; SOUZA JR, Cláudio Lopes de; SOUZA, Anete Pereira de. Microsatellite-assisted backcross selection in maize. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 789-797, 2005.

BERLINA, Anna N.; ZHERDEV, Anatoly V.; DZANTIEV, Boris B. ELISA and lateral flow immunoassay for the detection of food colorants: State of the art. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 209-223, 2019.

CANÇADO, G.M.A.; SANTANA, G.C.; VAL, A.D.B.; FERREIRA, J.L. Marcadores moleculares de DNA e suas aplicações na caracterização, identificação e melhoramento genético da Oliveira. In: OLIVEIRA, A.F. *Oliveira no Brasil: Tecnologias de Produção*, EPAMIG, 2012. p. 225-249.

DATUKISHVILI, N., KUTATELADZE, T.; GABRIADZE, I.; BITSKINASHVILI; VISHNEPOLSKY, B. **New multiplex PCR methods for rapid screening of genetically modified organisms in foods**. 24 July 2015.

DAVIS, Diana *et al.* **Bio-Plex™ suspension array system: principles of curve fitting for multiplex sandwich immunoassays**. [S.I]: Bio-Rad Laboratories Inc., 2000. 4 p.

DEVI, E.L.; HOSSAIN, F.; MUTHUSAMY, V.; CHHABRA, R.; ZUNJARE, R.U.; BAVEJA, A.; JAISWAL, S.K.; GOSWAMI, R.; DOSAD, S. Microsatellite marker-based characterization of waxy maize inbreds for their utilization in hybrid breeding. p. 2-9, 2017.

EMBRAPA (Brasil). **Sistema de Produção Embrapa: cultivo do milho**. 9. ed. [S.I]: Embrapa Milho e Sorgo, 2015. 662 p. ISSN 1679-012X 1.

FAHEEM, Aroosha *et al.* Advances in the Immunoassays for Detection of Bacillus thuringiensis Crystalline Toxins. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 69, n. 36, p. 10407-10418, 28 jul. 2021. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.1c02195>.

FUENTES, A. A. V.; ESPINOZA, L. C.; CORONADO, M. A. G.; CARRILLO, J. L. M. **Metodologías para el análisis de expresión y cuantificación de proteínas conferidas en tejidos de cultivos GM.** Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas volumen 10 número 4 16 de mayo - 29 de junio, 2019.

FAHEEM, Aroosha et al. Advances in the Immunoassays for Detection of Bacillus thuringiensis Crystalline Toxins. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 69, n. 36, p. 10407-10418, 28 jul. 2021. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.1c02195>.

FAUSTO, Mariana Costa. **PADRONIZAÇÃO DE ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS (ELISA) PARA SOROLOGIA, DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO FO CIRCOVÍRUS SUÍNO 2.** 2010. 60 f. Dissertação (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

FONTANIVE, Daniel Erison *et al.* PRODUTIVIDADE DE MILHO CRIOULO EM TRÊS ANOS AGRÍCOLAS, CULTIVADO EM SISTEMA DE BAIXA TECNOLOGIA NO NOROESTE DO RIO GRANDE DO SUL. In: 9º SALÃO INTEGRADO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 9., 2019, Porto Alegre/Rs. **SIEPEX**. Porto Alegre/Rs: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2019. p. 1-4.

GUIMARÃES, C.T.; MAGALHÃES, J.V.; LANZA, M.A.; SCHUSTER, I. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 253, p. 3-10, 2009.

GROTHAUS, G. David *et al.* Immunoassay as an Analytical Tool in Agricultural Biotechnology. **Journal Of Aoac International**, [s. l.], v. 89, n. 4, p. 913-928, abr. 2006.

HAN, Li *et al.* Development of a Direct Competitive ELISA Kit for Detecting Deoxynivalenol Contamination in Wheat. **Molecules**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 50-63, 22 dez. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25010050>.

JIANG, G. Molecular Markers. **Encyclopedia of Applied Plant Sciences**, v. 2, n. 2, p. 3-8, 2017.

KONSTANTINOOU, G. N. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l: s.n.]. v. 1592p. 79–94, 2017.

KRISHNAPPA, G. *et al.* **Integrated genomic selection for rapid improvement of crops** **Genomics**, 2021.

KOSTADINOVIĆ, Marija *et al.* Marker assisted backcross breeding in Maize Research Institute Zemun Polje. **Selekcija I Semearstvo**, [S.L.], v. 25, n. 1, p. 41-47, 2019. Centre for Evaluation in Education and Science (CEON/CEES). <http://dx.doi.org/10.5937/selsem1901041k>.

LIN, Alice V. Direct ELISA. In: **ELISA**. Humana Press, New York, NY, 2015. p. 61-67.

Lipton, C. R., Dautlick, J. X., Grothaus, G. D., Hunst, P. L., Magin, K. M., Mihaliak, C. A., Rubio, F. M., and Stave, J. W. Guidelines for the validation and use of immunoassays for determination of introduced proteins in biotechnology enhanced crops and derived food ingredients. *FoodAgric. Immunol.*, 2000, 12, 156–164.

LIM, Li Yang; MAJID, Abdul Hafiz Ab. Development and Characterization of Novel Polymorphic Microsatellite Markers for *Tapinoma indicum* (Hymenoptera: formicidae). **Journal Of Insect Science**, [S.L.], v. 21, n. 4, p. 1-6, 1 jul. 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jisesa/ieab047>.

MAPA. Instrução Normativa Interministerial n.01, de 1º de abril de 2004. p. 4.
PEI, Ke et al. Colorimetric ELISA with an acid–base indicator for sensitive detection of ochratoxin A in corn samples. **Analytical methods**, v. 10, n. 1, p. 30-36, 2018.

MALLICK, Niharika *et al.* Marker-Assisted Improvement of Bread Wheat Variety HD2967 for Leaf and Stripe Rust Resistance. **Plants**, [S.L.], v. 11, n. 9, p. 1152-1167, 24 abr. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants11091152>.

MESQUITA, A.G.G. *et al.* Recuperação do Genitor Recorrente em Milho Utilizando Retrocruzamento Assistido por Marcadores Microsatélites. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, [S.L.], v. 4, n. 3, p. 275-285, 30 dez. 2005. Revista Brasileira de Milho e Sorgo. <http://dx.doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v4n3p275-285>.

MESQUITA, Antônio Gilson Gomes. **RETROCRUZAMENTO ASSISTIDO POR MARCADORES SSRS EM MILHO**. 2002. 59 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

MELLO, Bianca Vieira de. **ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Acrocomia spp* POR MARCADORES MICROSSATÉLITES**. 2018. 59 f. Dissertação (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Agricultura Tropical e Subtropical, Área de Concentração em Genética, Melhoramento e Biotecnologia Vegetal., Instituto Agrônomo, Campinas, 2018.

MIAH, Gous *et al.* Recurrent parent genome recovery analysis in a marker-assisted backcrossing program of rice (*Oryza sativa* L.). **Comptes Rendus Biologies**, [S.L.], v. 338, n. 2, p. 83-94, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crv.2014.11.003>.

OLIVEIRA, Altacis Junior *et al.* Principais marcadores moleculares. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 10, n. 15, p. e562101523633, 26 nov. 2021. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i15.23633>.

ORTON, Thomas J.. The Backcross Method. **Horticultural Plant Breeding**, [S.L.], v. [S.I.], n. [S.I.], p. 327-344, 2020. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-815396-3.00018-4>.

POSSAS, Jorge Luiz dos Santos. **PRÉ VALIDAÇÃO DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE OVOALBUMINA NA VACINA CONTRA FEBRE AMARELA**. 2012. 48 f. Monografia (Especialização) - Curso de Especialização em Controle da Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços Vinculados À Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.

QIN, Ya-Juan et al. Comparison of double antigen sandwich and indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of hepatitis C virus antibodies. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 34, n. 11, p. e23481, 2020.

RAMOS, Leandro Nogueira. **HÍBRIDOS DE MILHO GENETICAMENTE MODIFICADOS COMPARADOS A HÍBRIDOS DE MILHO CONVENCIONAIS EM TERRAS ALTAS DO BRASIL CENTRAL**. 2018. 98 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Agronomia, Universidade de Brasília, Brasília, 2018. Cap. 98.

REGITANO, L.C.A.; VENERONI, G.B. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento animal. **Embrapa Pecuária Sudeste**, p.6-20, 2009.

SAATH, K. C. DE O.; FACHINELLO, A. L. Crescimento da Demanda Mundial de Alimentos e Restrições do Fator Terra no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 56, n. 2, p. 195–212, 2018.

SILVA, Lucas Pereira da *et al.* Transferibilidade de marcadores microssatélites para espécies silvestres de maracujazeiro. **Revista de Ciências Agrárias**, [S.L.], v. 62, p. 1-6, mar. 2019. Tikinet Edicao Ltda. - EPP. <http://dx.doi.org/10.22491/rca.2019.2914>.

SILVA, Michele Jorge da. **INCORPORAÇÃO DO ALELO bmr-6 “BROWN MIDRIB” E ANÁLISE DIALÉLICA EM LINHAGENS ELITES DE SORGO BIOMASSA COM NERVURA MARRON**. 2019. 67 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2019.

SILVA, L. E. B. *et al.* Desenvolvimento da cultura do milho (*Zea mays* L.): revisão de literatura. **Diversitas Journal**, v. 5, n. 3, p. 1636–1657, 2020.

SOUZA, Elton Otacílio de. **INFLUÊNCIA DA DISTÂNCIA GENÉTICA ENTRE GENITORES NA RECUPERAÇÃO DO PARENTAL RECORRENTE NA CONVERSÃO DE LINHAGENS DE MILHO**. 2021. 31 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, 2021.

SOUZA, Isabel Regina Prazeres de *et al.* **Seleção e Introgressão da Resistência ao Mosaico-Comum em Milho via Retrocruzamento Assistido por Marcadores Moleculares**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2018. 22 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 174).

SHAH, Karishma; MAGHSOUDLOU, Panagiotis. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. **British journal of hospital medicine**, v. 77, n. 7, p. C98-C101, 2016.

SINGH, Gurmit *et al.* Development of a polyclonal antibody-based indirect competitive ELISA for determination of sterigmatocystin in wheat and corn flours. **Food Additives & Contaminants: Part A**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 327-335, 29 jan. 2019. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2019.1567943>.

SOUZA, de E. O.; MÔRO, G. V.; SCHUSTER, I. Influência da distância genética entre genitores na recuperação do parental recorrente na conversão de linhagens de milho.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. p.45. 2021.

STAVE, James W. Protein Immunoassay Methods for Detection of Biotech Crops: Applications, Limitations, and Practical Considerations. **Journal Of Aoac International**, [S.I.], v. 85, n. 3, p. 780-786, 2002.

TRAN, Renee J.; SLY, Krystal L.; CONBOY, John C. Revealing the kinetic advantage of a competitive small-molecule immunoassay by direct detection. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 19, p. 13163-13171, 2020.

VIEIRA, M.L.C.; SANTINI, L.; DINIZ, A.L.; MUNHOZ, C.F. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. **Departamento de Genética**, p. 3-17, 2016.

ZATERKA, L. **Transgênicos e o princípio de equivalência substancial**. Estudos Avançados 33 (95), 2019.

ZHANG, Jin-Ru *et al.* Development of a Simple Pretreatment Immunoassay Based on an Organic Solvent-Tolerant Nanobody for the Detection of Carbofuran in Vegetable and Fruit Samples. **Biomolecules**, [S.L.], v. 9, n. 10, p. 576-589, 7 out. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom9100576>.

XIONG, Ying *et al.* Emerging strategies to enhance the sensitivity of competitive ELISA for detection of chemical contaminants in food samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 126, p. 115861, 2020.

WU, Songsong *et al.* Development of a competitive immunochromatographic assay for the sensitive detection of amantadine in chicken muscle. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 232, n. [S.I.], p. 770-776, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.058>.

APÊNDICE

Apêndice A – Identificação, sentido, nome, sequência e temperatura de anelamento dos marcadores microssatélites utilizados (Continua).

Nº DO PRIMER	PRIMER F/R	NOME DO PRIMER	SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS	TEMPERATURA DE ANELAMENTO
1	F	phi427913	VIC CAAAAGCTAGTCGGGGTCA	50°C
	R	phi427913	ATTGTTTCGATGACACACTACGC	
2	F	phi265454	6FAM CAAGCACCTCAACCTCTTCG	60°C
	R	phi265454	TCCACGCTGCTCACCTTC	
3	F	phi083	VIC CAAACATCAGCCAGAGACAAGGAC	62.5°C
	R	phi083	ATTCATCGACGCGTCACAGTCTACT	
4	F	phi090	6FAM CTACCTATCCAAGCGATGGGGA	62.5°C
	R	phi090	CGTGCAAATAATTCCCCGTGGGA	
5	F	phi243966	6FAM CGACCGAAACGAATCAAAA	55°C
	R	phi243966	TACTAGGCTGACACGCACG	
6	F	phi102228	6FAM ATTCCGACGCAATCAACA	55°C
	R	phi102228	TTCATCTCCTCCAGGAGCCTT	
7	F	phi213984	6FAM GTGACCTAAACTTGGCAGACCC	60°C
	R	phi213984	CAAGAGGTACCTGCATGGC	
8	F	phi093	PET AGTGCCTCAGCTTCATCGCCTACAAG	62,5°C
	R	phi093	AGGCCATGCATGCTTGCAACAATGGATACA	
9	F	phi396160	VIC GGAGCCTCCTCAACCCTT	60°C
	R	phi396160	GCTCGAGGTCCATGAGCA	
10	F	phi333597	PET AGCTCGAGTACCTGCCGAG	60°C
	R	phi333597	TGCATCTCTGAGACCATCACC	
11	F	phi423796	VIC CACTACTCGATCTGAACCACCA	60°C
	R	phi423796	CGCTCTGTGAATTTGCTAGCTC	
12	F	phi364545	PET TAAGCAAAGCAAGGCAACC	57.5°C
	R	phi364545	TCGCCTCACTCTCACACTCC	
13	F	phi034	6FAM TAGCGACAGGATGGCCTCTTCT	62.5°C
	R	phi034	GGGGAGCACGCCCTTCGTTCT	
14	F	phi260485	6FAM TCATTTCGACAGAGGCAAAAAG	57.5°C
	R	phi260485	CATGGGAACCTAACACTGGATGC	
15	F	phi233376	6FAM CCGGCAGTCGATTACTCC	57.5°C
	R	phi233376	CGAGACCAAGAGAACCCTCA	
16	F	phi015	6FAM GCAACGTACCGTACCTTTCCGA	60°C
	R	phi015	ACGCTGCATTCAATTACCGGGAAG	
17	F	phi033	VIC ATCGAAATGCAGGCGATGGTTCTC	62.5°C
	R	phi033	ATCGAGATGTTCTACGCCCTGAAGT	
18	F	phi236654	6FAM GCTTGTTCCTTGGTTCG	57.5°C
	R	phi236654	GGACTCGCGAATAAGGTCTGG	

19	F	phi059	6FAM AAGCTAATTAAGCCGGTCATCCC	62,5°C
	R	phi059	TCCGTGTACTCGGCCGACTC	
20	F	phi062	VIC CCAACCCGCTAGGCTACTTCAA	62,5°C
	R	phi062	ATGCCATGCGTTCGCTCTGTATC	
21	F	p-umc1071	VIC AGGAAGACACGAGAGACACCGTAG	60°C
	R	p-umc1071	GTGGTTGTGCGAGTTCGTCGTATT	
22	F	p-mmc0103	VIC CTGCTGCTGGTACTACTACGT	57,5°C
	R	p-mmc0103	CTCACCAGTGTGAATGTTTTT	
23	F	p-phi109275	VIC CGGTTCATGCTAGCTCTGC	57,5°C
	R	p-phi109275	GTTGTGGCTGTGGTGGTG	
24	F	p-phi339017	VIC ACTGCTGTTGGGGTAGGG	57,5°C
	R	p-phi339017	GCAGCTTGAGCAGGAAGC	
25	F	p-phi002	VIC CATGCAATCAATAACGATGGCGAGT	62,5°C
	R	p-phi002	TTAGCGTAACCCTTCTCCAGTCAGC	
26	F	p-phi423298	VIC GGGCTGCTACTTTGACAAGGAC	60°C
	R	p-phi423298	CCTCCATCATCCGCTGGTA	
27	F	p-mmc0041	VIC AGGACTTAGAGAGAAACGAA	55°C
	R	p-mmc0041	TTTATCCTTACTTGCAGTTGC	
28	F	p-phi323065	6FAM GATCGATCGACACCAGC	57,5°C
	R	p-phi323065	CTTCTGCGTGGGCAAAGA	
29	F	p-phi011	VIC TGTTGCTCGGTCACCATAACC	60°C
	R	p-phi011	GCACACACACAGGACGACAGT	
30	F	p-phi308707	VIC GCAACAAGATCCAGCCGAT	57,5°C
	R	p-phi308707	GTCGCCCTCATATGACCTTC	
31	F	p-phi227562	VIC TGATAAAGCTCAGCCACAAGG	57,5°C
	R	p-phi227562	ATCTCGGCTACGGCCAGA	
32	F	p-phi96100	VIC AGGAGGACCCCAACTCCTG	60°C
	R	p-phi96100	TTGCACGAGCCATCGTAT	
33	F	p-mmc0111	VIC TACTGGGGATTAGAGCAGAAG	57,5°C
	R	p-mmc0111	AATCTATGTGTGAACAGCAGC	
34	F	p-phi109642	VIC CTCTCTTTCCTCCGACTTCC	60°C
	R	p-phi109642	GAGCGAGCGAGAGAGATCG	
35	F	p-mmc0231	VIC GAGCGACTGCGAGACGG	60°C
	R	p-mmc0231	AGATCGCGCCACCGCTC	
36	F	p-mmc0491	VIC TTGCCTTTCAGTCCACTATC	57,5°C
	R	p-mmc0491	ATGTACAGTGCAGATGACACA	
37	F	p-mmc0401	VIC CTCAGCTGCACTCCACA	55°C
	R	p-mmc0401	CCTTCTTCTTCTCCAGC	
38	F	p-phi251315	VIC CCAGTCCAATGGAGAGGG	57,5°C
	R	p-phi251315	GAGATTTCCCTGCAGGACT	
39	F	p-mmc0191	6FAM GGTGTTCAAGTGTGAAAGGTTA	57,5°C
	R	p-mmc0191	AAGATTTCCGCAAGGTTAAAC	

40	F	p-mmc0143	VIC CTCTGGTGCTGGACGAAGAT	60°C
	R	p-mmc0143	TACGCTGCCGCGACTTTTCG	
41	F	p-mmc0271	VIC CGTAATGCGTAGCAACATAG	55°C
	R	p-mmc0271	CAACATCCTTTCCACCG	
42	F	p-phi427434	6FAM CAACTGACGCTGATGGATG	57.5°C
	R	p-phi427434	TTGCGGTGTTAAGCAATTCTCC	
43	F	p-phi435417	VIC CTGACGCCACTGTTGCTTG	60°C
	R	p-phi435417	AAAAGTAGCCAATCTGCCACG	
44	F	p-phi127	6FAM ATATGCATTGCCTGGAAGTGAAGGA	62.5°C
	R	p-phi127	AATTCAAACACGCTCCCGAGTGT	
45	F	p-phi328189	6FAM ACGCTCGAAGCAAATCCT	57.5°C
	R	p-phi328189	TCGCGCTTGGTAGACGTA	
46	F	p-mmc0381	VIC GTGGCCCTGTTGATGAG	57.5°C
	R	p-mmc0381	CGACGAGTACCAGGCAT	
47	F	p-phi104127	6FAM CTTTGCTGCTTCCTACG	60°C
	R	p-phi104127	AACCAGTGACGTACACAAAGCA	
48	F	p-phi453121	VIC ACCTTGCTGCTCCTTTCT	60°C
	R	p-phi453121	CAAGCAAGACTTTTGATCAGCC	
49	F	p-phi193225	6FAM GCTCTTGGCGTCTTCTT	60°C
	R	p-phi193225	GCGGGGAGGTGAAGAGCTA	
50	F	p-phi374118	6FAM TACCCGGACATGGTTGAGC	60°C
	R	p-phi374118	TGAAGGGTGTCTTCCGAT	
51	F	p-mmc0312	VIC CCTGATGAAACAGTCCAATT	55°C
	R	p-mmc0312	ATCTGCTGGTGATACCTCC	
52	F	p-mmc0251	6FAM TATAATGGCCCTTGACTATCA	55°C
	R	p-mmc0251	GCACACCTATGGGGAAA	
53	F	p-mmc0001	VIC ATTGAGAAGATGAGAACCGTC	57.5°C
	R	p-mmc0001	CCTACAAATGCAACAAATGCT	
54	F	p-phi072	6FAM ACCGTGCATGATTAATTTCCAGCCTT	62.5°C
	R	p-phi072	GACAGCGCGCAAATGGATTGAACT	
55	F	p-phi295450	6FAM CCTTTTCATGTTGCTTTCCC	57.5°C
	R	p-phi295450	GCCCAATCCTTCTTCTCT	
56	F	p-umc1288	VIC ATAGATTCAGTGTGGACCGAGGA	60°C
	R	p-umc1288	ATCCGGACAAATTGAACTTTCATC	
57	F	p-phi308090	6FAM CAGTCTGCCACGAAGCAA	52.5°C
	R	p-phi308090	CTGTGCGTTTCGGTCTTCTT	
58	F	p-mmc0471	6FAM TTAGCACATTTGAAGAGTTTGG	47.5
	R	p-mmc0471	TTTCCTTCACGTTTCTCTGT	
59	F	p-phi096	6FAM TCCACCATTTGACACTTAGGCA	55°C
	R	p-phi096	GCGTAGGACGACCGTTGAA	
60	F	p-mmc0341	VIC CTGACGATTCATGTGGCT	50.0°C
	R	p-mmc0341	TCCTAGTACACCGCAACTCT	

61	F	p-mmc0321	6FAM TAATCCGAGCTGCAGAG	50.0°C
	R	p-mmc0321	CACATGAGCTGAGCATCA	
62	F	p-mmc0121	6FAM GATCATGCTCTCTGATGCTT	52.5°C
	R	p-mmc0121	GGCTCCTTTTAAGACCAAGTCG	
63	F	p-phi109188	PET AAGCTCAGAAGCCGGAGC	55°C
	R	p-phi109188	GGTCATCAAGCTCTCTGATCG	
64	F	p-bnlg1902	6FAM AACTACCGTCAAGTGGTGG	55°C
	R	p-bnlg1902	CGCTCTCTCTGACTTGTTG	
65	F	p-mmc0351	6FAM GCAGTGCATGTATCTGATCTAC	50.0°C
	R	p-mmc0351	AGGCTCTCTTGATCCTTCA	
66	F	p-mmc0081	6FAM TGAAATAATTCACAGCACTCC	52.5°C
	R	p-mmc0081	TGATAGCACAACACAGCTATG	
67	F	p-mmc0282	6FAM CTCTTTCTTTATTTGTTCCGTT	50.0°C
	R	p-mmc0282	GGACTACACATCACCAGCA	
68	F	p-phi085	6FAM AGCAGAACGGCAAGGGCTACT	57.5°C
	R	p-phi085	TTTGGCACACCACGACGA	
69	F	p-mmc0481	6FAM TGTTGAGCCGTTCTAGACT	52.5°C
	R	p-mmc0481	GCTACCCATTGCTATGGTTTTCTG	
70	F	p-Y1ss	PET CAAGAAGAGGAGAGGCCGGA	50.0°C
	R	p-Y1ss	TTGAGCAGGGTGGAGCACTG	
71	F	p-phi389203	6FAM GACGAAAAGGTGGCTCGT	60°C
	R	p-phi389203	TGCAGTCCTAGATCAGTTCCAA	
72	F	p-phi452693	PET CAAGTGCTCCGAGATCTTCCA	57.5°C
	R	p-phi452693	CGCGAACATATTCAGAAGTTTG	
73	F	p-mmc0523	PET AGACCCTGCTGCTAGCTAG	57.5°C
	R	p-mmc0523	CCCTCTCTTCACCCCTT	
74	F	p-phi445613	6FAM TGACCACACACGAGCGAG	60°C
	R	p-phi445613	GCTCACAATATGTGGCAGAGG	
75	F	p-phi299852	6FAM GATGTGGGTGCTACGAGCC	60°C
	R	p-phi299852	AGATCTCGGAGCTCGGCTA	
76	F	p-phi070	6FAM GCTGAGCGATCAGTTCATCCAG	60°C
	R	p-phi070	CCATGGCAGGGTCTCTCAAG	
77	F	p-mmc0171	6FAM AATCCTACTTGCTGCCAAAGC	57.5°C
	R	p-mmc0171	CTTTGAGCTTTTTGTGTGGAC	
78	F	p-umc1066	6FAM ATGGAGCACGTCATCTCAATGG	62.5°C
	R	p-umc1066	AGCAGCAGCAACGTCTATGACT	
79	F	p-mmc0411	PET ACTCCCTAGTGCAAAAATCA	57.5°C
	R	p-mmc0411	CGATGCAAGAGTGTCAAGTA	
80	F	p-phi328175	PET GGGAAGTGCTCCTTGCAG	57.5°C
	R	p-phi328175	CGGTAGGTGAACGCGGTA	
81	F	p-phi069	6FAM AGACACCGCCGTGGTCGTC	62.5°C
	R	p-phi069	AGTCCGGTCCACCTCCTTC	

82	F	p-bnlg2289	PET CACAAGCATGGAGGAAGACA	57.5°C
	R	p-bnlg2289	GAGGAGAAACGAAGCCACTG	
83	F	p-phi100175	PET TATCTGACGAATCCCATTCCC	57.5°C
	R	p-phi100175	GTACGTAACGGACGGACGG	
84	F	p-phi121	PET AGGAAAATGGAGCCGGTGAACCA	62.5°C
	R	p-phi121	TTGGTCTGGACCAAGCACATACAC	
85	F	p-phi115	PET GCTCCGTGTTTCGCTGAA	62.5°C
	R	p-phi115	ACCATCACCTGAATCCATCACA	
86	F	p-bnlg1031	6FAM AATCGGTGAGGCTTCACAAC	60°C
	R	p-bnlg1031	ATGCCTACCTACCACCATGC	
87	F	p-umc1636	PET CATATCAGTCGTTTCGTCAGCTAA	62.5°C
	R	p-umc1636	GTAAGTGGTACAGGTCGTCGCTCTT	
88	F	p-umc1893	PET TCCAGTGCCACCCCTAGATAGTAA	62.5°C
	R	p-umc1893	ACCCCAGAGTATCTCATCACCCCTT	
89	F	p-phi032	PET CTCAGCAAGTGATGCGTGAC	62.5°C
	R	p-phi032	GACACCCGGATCAATGATGGAAC	
90	F	p-phi236654	PET GCTTGTTCCTTGGTCTG	57.5°C
	R	p-phi236654	GGACTCGCGAATAAGGTCTGG	
91	F	p-phi108411	PET CGTCCCTGGATTTCGAC	57.5°C
	R	p-phi108411	CGTACGGGACCTGTCAACAA	
92	F	p-phi448880	PET CGATCCGGAGGAGTTCCTTA	57.5°C
	R	p-phi448880	CCATGAACATGCCAATGC	
93	F	p-phi96342	PET GTAATCCCACGTCTATCAGCC	60°C
	R	p-phi96342	TCCAACCTGAACGAACTCCTC	
94	F	p-phi301654	PET GAATGCATGCTTTTCAAGGAC	57.5°C
	R	p-phi301654	CGCACAGAGAGCAGAACG	
95	F	p-phi323152	PET TCAGGGAGCTCACCTACTACGG	60°C
	R	p-phi323152	CACGACTGCACCGATTAGC	
96	F	p-umc1061	PET AGCAGGAGTACCCATGAAAGTCC	62.5°C
	R	p-umc1061	TATCACAGCACGAAGCGATAGATG	
97	F	p-bnlg1805	6FAM GCCCGTTTGCTAAGAGAATG	57.5°C
	R	p-bnlg1805	TGTTTCGAGCATTGTGCTTTG	
98	F	p-phi260485	6FAM TCATTTCGACAGAGGCAAAAAG	57.5°C
	R	p-phi260485	CATGGGAACTAACACTGGATGC	
99	F	p-bnlg125	VIC GGGACAAAAGAAGAAGCAGAG	57.5°C
	R	p-bnlg125	GAAATGGGACAGAGACAGACAAT	
100	F	p-bnlg1006	VIC GACCAGCGTGTGATCCC	60°C
	R	p-bnlg1006	GGAGACCCCGACTCTCTCTC	

ANEXO I

PRODUTO TÉCNICO ATRELADO

TUTORIAL PARA ANÁLISE MOLECULAR DE MATERIAIS TRANSGÊNICOS POR MARCADORES MOLECULARES

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de plantas transgênicas gera plantas com qualidades agronômicas desejáveis. A biotecnologia agrícola ganha espaço visando o melhoramento genético das culturas como o milho. Para seleção de plantas transgênicas, análises moleculares são imprescindíveis, uma vez que fornecem resultados que confirmam a presença e expressão do gene exógeno (Liu *et al*, 2021).

Parte das análises moleculares de materiais transgênicos envolve o estudo a nível de DNA, especialmente quando se almeja definir a porcentagem de fixação do loci de genitores durante o processo de conversão após introgressão do novo transgene. A extração do DNA de tecidos vegetais é um passo muito importante, especialmente para análises com marcadores moleculares de amplo espectro genômico. Para obtenção de DNA de qualidade, existem diversos procedimentos para extração do material genético. O DNA pode ser obtido de folhas frescas, liofilizadas ou congeladas, além das outras partes da cultivar, como as sementes e raízes. (Gomes, 2019).

Após obtenção do material genético, o próximo passo é a sua amplificação utilizando marcadores desenvolvidos para os loci de interesse. A amplificação é conduzida por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase – do inglês *Polimerase Chain Reaction*), uma técnica desenvolvida em 1983 por Kary Mullis que envolve a exposição do material genético e demais reagentes necessários para amplificação a oscilações de temperatura para permitir a amplificação do número de cópias de DNA-alvo *in vitro*. Para iniciar a amplificação, primeiramente o DNA é submetido a um superaquecimento (em torno de 95°C) para que as pontes de hidrogênio entre os nucleotídeos da dupla-fita sejam desfeitas. Após a desnaturação

do DNA, agora em fita simples, *primers* são requeridos para amplificação da sequência de interesse.

Para isso, a temperatura é reduzida a 50-60°C para que os *primers forward* e *reverse* anelem nas regiões que flanqueiam a sequência-alvo, evento que sinaliza para a enzima polimerase que os nucleotídeos podem ser adicionados na região em questão. O evento de adição de nucleotídeos acontece em torno de 72°C e é conduzido por uma polimerase termoestável nomeada Taq polimerase, uma vez que foi originalmente isolada de uma bactéria termofílica.

A atividade da Taq polimerase depende da presença de um tampão, o qual gera pH ótimo para sua atividade enzimática, e do seu cofator enzimático Magnésio disponível em uma solução de MgCl₂.

Após a adição de nucleotídeos pela polimerase, o DNA-molde é novamente aquecido e todo processo é reiniciado e conduzido em torno de 30-35 ciclos para multiplicação exponencial da sequência-alvo.

O produto de PCR obtido pode ser avaliado quantitativamente em analisadores genéticos robustos, quando a reação de PCR é conduzida com *primers* marcados com fluoróforos, ou submetidos a eletroforese em gel de agarose para análise qualitativa da sequência-alvo amplificada. Essa última técnica é baseada na velocidade de migração de amostras carregadas sob aplicação de um campo elétrico. Como o DNA aplicado apresenta carga negativa, o campo elétrico gerado por diferentes íons presentes em uma solução-tampão possibilita a migração da amostra do polo negativo para o polo positivo do sistema eletroforético (Petrucci *et al*, 2022). Para a eletroforese, a amostra é preparada com um tampão denominado *loading buffer* e um corante sensível a luz UV, os quais possibilitam, respectivamente, o acompanhamento da progressão das bandas e a visualização do fragmento amplificado. Após o término da eletroforese em gel de agarose, os resultados são visualizados no formato de bandas, as quais apresentam velocidade de migração inversamente proporcional ao número de pares de base. Dessa forma, fragmentos com número de pares de bases diferentes podem ser visualizado em diferentes níveis da matriz do gel de agarose, após.

Diante a importância e ampla aplicabilidade das técnicas moleculares descritas acima no desenvolvimento e avaliação de transgênicos, este tutorial apresenta o intuito de demonstrar os procedimentos utilizados para avaliação qualitativa de *traits* em materiais transgênicos ou a confirmação da ausência deles em materiais convencionais.

1. ALCANCE

Deteção de *traits* em milho transgênico utilizando marcadores moleculares.

2. MATERIAL

Luvas	Pipetas
Rack	Ponteiras
Microtubos	Reagente de extração TRITON X
Pistilo de plástico	Nitrogênio Líquido
Álcool 92,8%	

3. OBJETIVO

Este procedimento estabelece as diretrizes para análise e deteção molecular de *traits* em materiais de milho transgênico.

4. EXTRAÇÃO DE DNA EM SEMENTES E FOLHAS

As extrações são realizadas de acordo com estudos de Gomes (2019) que se refere ao protocolo Triton X-100 com algumas modificações no laboratório de biotecnologia da empresa Helix Sementes e Biotecnologia Ltda. Após a extração é realizada a quantificação do material genético extraído para verificação da concentração de DNA que seja igual ou superior a 100ng/ μ L e qualidade que seja entre 1,8 a 2,00.

Segue abaixo o resultado das extrações das linhagens analisadas para o desenvolvimento deste estudo. Foram realizadas apenas uma extração para cada linhagem, como o protocolo para extração em folhas é bem desenvolvido não foi feito em duplicata. Todas as linhagens Convencionais e OGM apresentaram concentrações de DNA e qualidade como esperado (Tabela 1).

Tabela 1: Concentração de DNA em ng/ μ L e qualidade da extração em folhas.

Linhagem	DNA ng/μL	Qualidade
L1 (Convencional)	806,7	1,92
L1 (OGM)	394,8	1,78
L2 (Convencional)	676,8	1,92
L2 (OGM)	557	1,93
L3 (Convencional)	571,8	1,92
L3 (OGM)	544,2	1,89

5. DILUIÇÃO DO DNA E PREPARO DA PCR

O DNA extraído é diluído para uma concentração de 100 ng/ μ L em um volume de 50 μ L. Os *primers* utilizados nesta análise são diluídos para concentração de trabalho de 5 μ M e são definidos como P1, P2 (evento transgênico 1) e C1 e C2 (evento transgênico 2). Na Tabela 1 são apresentadas as sequências dos marcadores utilizados. Na placa de reação, o DNA é adicionado na concentração de 100 ng/ μ L, seguido dos primers a 5 μ M. Por fim, é adicionado o reagente TaqPolimerase Platinum Supermix® a cada amostra a ser amplificada. A placa de reação com o mix de reagente é vedada com o adesivo termoresistente e levada ao termociclador SimpliAmp (ThermoFisher Scientific), o qual é configurado com as seguintes especificações: Desnaturação inicial a 95°C por 5min; 45 ciclos de: desnaturação a 94°C por 50 segundos, temperatura de anelamento dos primers de 63°C por 50 segundos, extensão de 72°C por 75 segundos; e extensão final a 72°C por 20 minutos.

Tabela 2: Sequência nucleotídicas dos marcadores moleculares e o tamanho em pares de base (pb) dos produtos de amplificação

Identificação	Foward	Reverse	Produto amplificado Pares de bases (pb)
P1	Gaagtccagctgccagaaac	Gcaccatcgtcaaccactac	530
P2	Gaaaccacgtcatgccag	Tacatcgagacaagcacggt	408
C1	Cgtacaactgctgtccaac	Ctcgtagtctgcaccctga	400
C2	Tcagggtgcagaactacgag	cagggagtcggtgtagatgg	500

6. PREPARO DO GEL DE AGAROSE e ELETROFORESE

O gel de agarose é preparado na concentração de 2,0 a 3,5%, o qual é indicada para análise de fragmentos entre 200-500 pares de bases. O preparo envolve a dissolução da agarose em tampão TBE 1X (Tris-Ácido Bórico-EDTA). Para isso, em um frasco do tipo Erlenmeyer, o tampão é adicionado à agarose previamente pesada. Antes do aquecimento para dissolução, é importante que a solução tampão em contato com a agarose permaneça em repouso por aproximadamente 15 minutos para evitar a formação excessiva de bolhas durante o aquecimento. Posteriormente, a solução é aquecida em micro-ondas por aproximadamente 5 minutos e então, o frasco é resfriado em água corrente até 55°C e vertido no gel tray com represador. As bolhas devem ser retiradas se presentes, uma vez que podem comprometer a qualidade da migração dos fragmentos a serem analisados. Rapidamente, o pente dentado deve ser adicionado para formação dos poços onde as amostras serão pipetadas e o gel deve polimerizar em repouso por aproximadamente 30 minutos.

Após finalização do preparo das reações de amplificação e do gel de agarose na concentração pretendida, aplique as reações no gel. (Azul de bromofenol e Gel Red). A reação de corrida é preparada com 2 ul de Loading buffer e 2 uL do intercalante Gel-Red® e 5ul da reação de PCR. Após homogeneização, o volume final de 9ul deve ser pipetado no poço do gel de agarose. Ao final da pipetagem das amostras no gel de agarose, plugar os cabos corretamente a cuba e a fonte para iniciar a corrida com os parâmetros de voltagem, amperagem, potência e tempo previamente definidos na fonte de acordo com o procedimento padrão do laboratório.

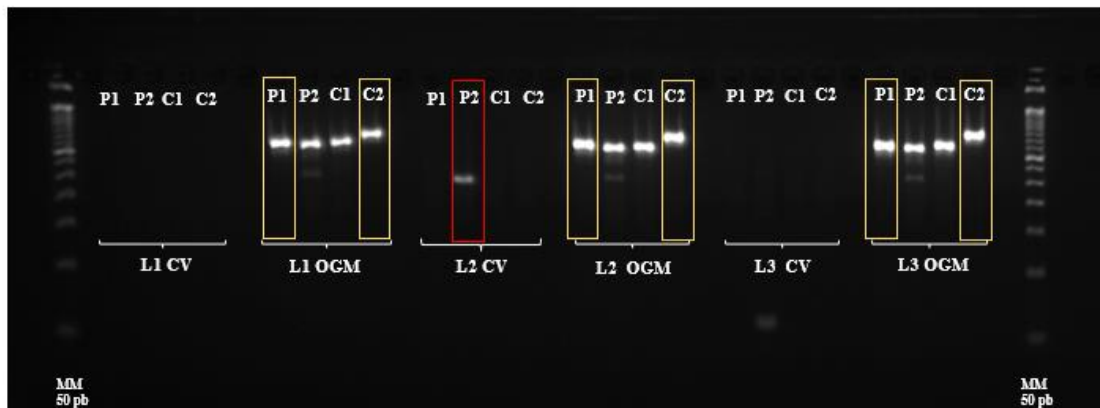
7. ANÁLISE DOS RESULTADOS DO GEL DE AGAROSE

Os marcadores indicam presença ou ausência do evento transgênico nos materiais analisados. No resultado da eletroforese, a ausência de bandas prediz que o material não apresenta o evento em questão, como mostrado na imagem do (Gel 1) abaixo nas linhagens convencionais.

Os resultados do gel 1 demonstram a ausência de banda para os primers P1, P2, C1 e C2 na linhagem convencional L1. Na linhagem L2 não foi observado a presença de bandas,

exceto para o marcador P2, porém definida como não-específica (~250 pb), uma vez que apresenta tamanho diferente do produto esperado (530 pb). A ausência de bandas evidencia a não amplificação da sequência transgênica nas linhagens L1 e L2, o que corrobora para a especificidade dos marcadores testados.

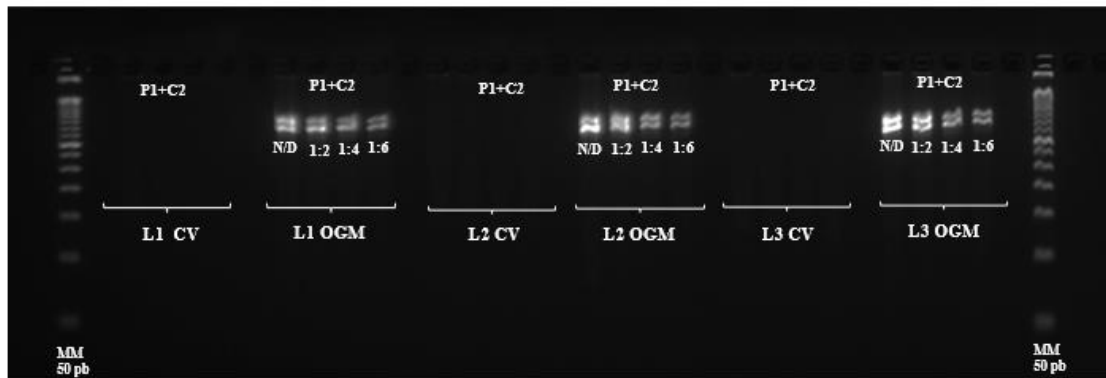
As linhagens com evento transgênico apresentam a banda com fragmento esperado para os marcadores testados, conforme marcador de peso molecular. A partir da leitura dos resultados, infere-se que os marcadores com melhores perfis de amplificação são P1 e C2, visto que apresentam maior especificidade de anelamento ao DNA-molde. Por outro lado, o produto amplificado pelo marcador C1, apesar de apresentar boa especificidade, apresenta tamanho muito próximo ao produto gerado pelo marcador P1, o que inviabiliza a utilização dos marcadores concomitantemente em uma reação eletroforética.



Gel 1: Gel de agarose 3,5% com aplicação dos produtos de PCR das linhagens L1, L2 e L3 (Convencionas e OGM) com os primers P1, P2, C1 e C2. Nota: N/D: Não diluído CV: Convencional MM: Marcador Molecular.

Fonte: Do autor (2023).

Após etapa de seleção dos melhores marcadores foi tomada a decisão da aplicação dos primers (P1+C2) no mesmo poço do gel de agarose para visualização dos dois genes (Informações confidenciais) como apresentado no gel 2. Devido à grande concentração de produto amplificado e a similaridade do tamanho dos fragmentos, a diluição do produto de PCR pode ser conduzida para otimizar a visualização das bandas na malha do gel de agarose. Portanto, foram realizadas três diluições diferentes 1:2, 1:4 e 1:6. Dentre as três diluições avaliadas a proporção de 1:4 e 1:6 potencializaram a qualidade esperada na visualização dos fragmentos no gel de agarose.



Gel 2: Gel de agarose 3,5% com aplicação dos produtos de PCR no mesmo poço, das linhagens L1, L2 e L3 (Convencionas e OGM) com os primers selecionados no gel 1 (P1 e C2).
Nota: N/D: Não diluído CV: Convencional MM: Marcador Molecular.

Fonte: Do autor (2023).

8. REFERÊNCIAS

De Gomes, M. L.Extração De DNA De Coffea arabica L.Monografia (Bacharel em Biotecnologia)-Univerdidade Federal de Uberlândia,Patos de Minas-MG, 2019.

Gonçalves, M. F. P. Biologia Molecular Aliada à Agricultura: Atividades Desenvolvidas em um laboratório de análises Genômicas e Biotecnológicas no Município de Toledo/pr.Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão-SC, 2022.

LIU, Fang *et al.* High-Throughput and Accurate Determination of Transgene Copy Number and Zygosity in Transgenic Maize: From DNA Extraction to Data Analysis. **International Journal Of Molecular Sciencers**. China, p. 2-3. 19 nov. 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/22/12487>. Acesso em: 09 fev. 2022.

Petruci, J. F. da S.; Martins, M. M.; Souza, R. A. C.; Do Nascimento, M. N. G.; Martins, C. de M.; De Moraes, S. A. L.; Danuello, A.; Pivatto, Marcos. Fundamentos da Eletroforese e Eletroforese Capilar. Fitoquímica: potencialidades biológicas dos biomas brasileiros - ISBN 978-65-5360-170-3 - Vol. 2. 2022.