



ROBERTA BARBOSA XAVIER

**QUALIDADE DOS MARCADORES SNP'S DE PUREZA
GENÉTICA NA CULTURA DO MILHO.**

LAVRAS - MG

2023

ROBERTA BARBOSA XAVIER

**QUALIDADE DOS MARCADORES SNP'S DE PUREZA GENÉTICA NA
CULTURA DO MILHO.**

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

Dra. Aurinelza Batista Teixeira Condé

Orientadora

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).

Xavier, Roberta Barbosa.

Qualidade dos marcadores SNP's de pureza genética na cultura
do milho / Roberta Barbosa Xavier. - 2023.

53 p.

Orientador(a): Aurinelza Batista Teixeira Condé.

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

Bibliografia.

1. Marcador molecular. 2. Pureza genética. 3. Seleção assistida
no milho. I. Condé, Aurinelza Batista Teixeira. II. Título.

ROBERTA BARBOSA XAVIER

**QUALIDADE DOS MARCADORES SNP'S DE PUREZA GENÉTICA NA
CULTURA DO MILHO.**

QUALITY OF SNP'S MARKERS OF GENETIC PURITY IN MAIZE CROP.

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

APROVADA em 14 de junho de 2023.

Dra. Aurinelza Batista Teixeira Condé EPAMIG

Prof. Dr. José Maria Villela Pádua UFLA

Dra. Ana Cristina Pinto Juhász EPAMIG

Dra. Aurinelza Batista Teixeira Condé

Orientadora

LAVRAS - MG

2023

AGRADECIMENTOS

A Deus pela dádiva da vida e o entusiasmo pela pesquisa.

Ao sistema de ensino público, que, nesta etapa, através da Universidade Federal de Lavras, me deu a oportunidade de realizar este mestrado.

A toda equipe do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas - Mestrado Profissional, pelo trabalho, apoio e disponibilidade durante a realização do mestrado.

A Dra. Aurinelza Batista Teixeira Condé pela oportunidade a mim concedida em me orientar neste trabalho, pelo apoio, ensinamentos, toda delicadeza e carinho durante essa jornada.

A toda equipe técnica do laboratório de genotipagem e de campo da Syngenta Seeds, pela oportunidade cedida para realização desse experimento, pois, sem a ajuda não seria possível a realização deste trabalho.

Aos professores pelos conhecimentos transmitidos, os quais muito ajudarão em minha vida profissional.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meu muito obrigado.

RESUMO

O crescente aumento da população mundial acarreta um dos maiores desafios dos melhoristas e pesquisadores de todo globo terrestre, a demanda por alimento que possa ser capaz de suprir as necessidades humanas a fim de eliminar a falta de alimento. Com uso das tecnologias dos marcadores moleculares é possível que se reduza o tempo de espera para que se conheça a carga genética da planta e todo seu potencial. Esta pesquisa tem como objetivo avaliar novos marcadores moleculares de pureza genética. A pesquisa foi realizada nas dependências da Syngenta Proteção de Cultivos, localizada no município de Uberlândia – MG, utilizando um híbrido de milho comercial safra 2021/2022 e dezesseis marcadores moleculares de pureza genética utilizando a tecnologia SNP. Dos marcadores utilizados, oito são experimentais com comportamento ainda desconhecidos, que foram comparados com outros oito marcadores conhecidos e consolidados. Para o experimento, foram coletados tecidos vegetais da cultura do milho (*Zea mays* L.) em diferentes dias após emergência do milho: 11, 16, 21, 30, 45 e 60 dias e em quantidades variáveis de tecido vegetal. As amostras foram subdivididas e coletadas em formato de discos vegetais contendo: 2, 4, 6 e 8 punches (discos vegetais) e também pedaços de ± 3 cm de tecido vegetal. Os tecidos coletados foram levados para o laboratório de genotipagem e analisados com intuito de verificar o comportamento dos marcadores a serem testados e se ambos seriam eficientes na captura de dados de interesse. Com as análises moleculares e estatísticas, concluiu-se que não houve diferenças significativas entre os tratamentos e ambos os marcadores possuem comportamento similares esperados.

Palavras-chaves: Pureza genética. Seleção assistida no milho. Marcador Molecular.

ABSTRACT

The growing world population entails one of the greatest challenges for breeders and researchers around the globe, the demand for food that may be able to meet human needs in order to eliminate food shortages. With the use of molecular marker technologies it is possible to reduce the waiting time to know the genetic load of the plant and its full potential. This research aims to evaluate new molecular markers of genetic purity. The research was carried out on the premises of Syngenta Crop Protection, located in the municipality of Uberlândia – MG, using a hybrid of commercial corn crop 2021/2022 and sixteen molecular markers of genetic purity using SNP technology. Of the markers used, eight are experimental with unknown behavior, which were compared with eight other known and consolidated markers. For the experiment, plant tissues were collected from the corn crop (*Zea mays* L.) on different days after corn emergence: 11, 16, 21, 30, 45 and 60 days and in varying amounts of plant tissue. The samples were subdivided and collected in the form of vegetable discs containing: 2, 4, 6 and 8 punches (vegetable discs) and also pieces of ± 3 cm of plant tissue. The collected tissues were taken to the genotyping laboratory and analyzed with the intention of verifying the behavior of the markers to be tested and whether both will be efficient in capturing data of interest. With the molecular and statistical analyses, it was concluded that there were no significant differences between the treatments and both markers have similar expected behavior.

Keywords: Genetic Purity. Assisted Selection in Corn. Molecular Marker.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Datas e quantidades de coleta de material vegetal da cultura do milho....	23
Tabela 2: Distribuição das análises assistidas em relação as amostras vegetais.....	26
Tabela 3 – Análises moleculares referente as coletas de tecido vegetal realizada aos onze dias pós plantio.....	29
Tabela 4 – Análises moleculares referente as coletas de tecido vegetal realizada aos dezesseis dias pós plantio.....	30
Tabela 5 – Análises moleculares referente as coletas de tecido vegetal realizada aos vinte e um dia pós plantio.....	31
Tabela 6 – Análises moleculares referente as coletas de tecido vegetal realizada aos trinta dias pós plantio.....	32
Tabela 7 – Análises moleculares referente as coletas de tecido vegetal realizada aos quarenta e cinco dias pós plantio.....	33
Tabela 8 – Análises moleculares referente as coletas de tecido vegetal realizada aos sessenta dias pós plantio.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação de uma sequência de SNP.....	18
Figura 2: Mapa de localização de amostras.....	24
Figura 3: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador M817.....	35
Figura 4: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador EXPM01.....	35
Figura 5: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador M820.....	36
Figura 6: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador EXPM02.....	36
Figura 7: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador M827.....	37
Figura 8: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador EXP03.....	37
Figura 9: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador M831.....	38
Figura 10: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador EXPM04.....	38
Figura 11: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador M842.....	39
Figura 12: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador EXPM05.....	39
Figura 13: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador M847.....	40
Figura 14: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador EXPM06.....	40
Figura 15: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador M850.....	41
Figura 16: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador EXPM07.....	41
Figura 17: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador M853.....	42
Figura 18: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador EXPM08.....	42
Figura 19: Classificação de toxicidade dos agrotóxicos referente à cor.....	49
Figura 20: Tabulação das informações encontradas a campo.....	51
Figura 21: Mapa de calor para visualização os pontos de controle.....	51
Figura 22: Mapa de calor mostrando os pontos de controle (verde), equilíbrio (amarelo) e dano econômico (vermelho).....	52

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	REFERÊNCIAL TEÓRICO	12
2.1.	Cultura do milho e sua expansão no Brasil.....	12
2.1.1.	Importâncias socioeconômicas do milho	13
2.1.2.	Programa de melhoramento genético no milho	14
2.2.	Marcadores moleculares	16
2.3.	Conceitos da técnica do marcador molecular SNP.....	17
2.3.1.	Aplicação do marcador molecular SNP.....	18
2.3.2.	As vantagens e desvantagens da técnica SNP	19
2.4.	Análises da utilização da seleção assistida.....	19
2.5.	Pureza Varietal	20
3.	OBJETIVOS	22
4.	MATERIAIS E MÉTODO	22
4.1.	Instalação do experimento	22
4.2.	Realização das coletas	23
4.3.	Análises moleculares	24
4.4.	Análises estatísticas	27
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
	REFERÊNCIAS	44
	ANEXO – PRODUTO TÉCNICO ATRELADO	48

1. INTRODUÇÃO

A cultura do milho é conhecida por ser de grande importância para o Brasil como também para o mundo. Ela alicerça a base da alimentação animal, abastecendo insumos para a indústria e atende a necessidade do consumo humano. Na safra 2020/21, a produção mundial do cereal aproximou-se de 1,17 bilhão de toneladas em uma área de aproximadamente 194,0 milhões de hectares. O Brasil, por sua vez, continua em um lugar de destaque na produção mundial de milho, ocupando o terceiro lugar como maior produtor, com um número expressivo atingindo aproximadamente 102,5 milhões de toneladas e uma área cultivada chegando quase a 19 milhões de hectares. Em 1920, houve o marco de um dos impulsos mais significativos à agricultura moderna, o surgimento do milho híbrido. Nos dias atuais, grande parte da produção mundial a larga escala de milho são obtidas através de cultivares híbridas (MASUKA et al., 2017).

Visando a necessidade de produção em grande escala para as culturas, são necessários à utilização das pesquisas e os avanços do melhoramento genético de plantas. Em busca de variedades resistentes a doenças, pragas, as intempéries e acima de tudo, com sabor agradável a população, agregando e acentuando sempre o valor nutritivo de cada cultura. Unindo e englobando todas as técnicas, métodos, estratégias como também, recursos utilizados para que algum progresso seja incorporado a uma espécie vegetal. Com isso, o progresso do melhoramento genético, está relacionado com a melhora do conteúdo genético da espécie estudada, com uma relação significativa com genótipo (ambiente) onde a espécie trabalhada será cultivada (BORÉM, 1997).

O melhoramento genético do milho no Brasil contribuiu expressivamente para o aumento de produtividade, com um incremento de 3800 kg ha⁻¹, desde 1960 (ANDORF et al., 2019).

Com a tecnologia do marcador de DNA, o melhoramento de plantas pôde começar a inferir na produtividade global, e esse marco teve seu início no começo da década de 1980. No início, os usos dos marcadores eram limitados, tanto pela falta de conhecimento e mão-de-obra qualificada, quanto ao seu alto custo, falta de incentivo e infraestrutura, principalmente nos países em desenvolvimento (RIBAUT et al., 2010).

Os marcadores de DNA podem ser postos em evidência e classificados pelos métodos que usam a combinação entre as enzimas de restrição e hibridação, entre as sequências complementares de DNA, como pode ser notado no Polimorfismo no comprimento de Restrição (RFLP) ou também pela técnica de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). Os usos desses

marcadores são mais empregados justamente por possuir um grande potencial pelo fato de serem praticamente ilimitados no fator números. Após a sua identificação e localização, são de fácil detecção e possui a vantagem de se comportarem como caracteres de herança simples e previsíveis. E, além de tudo são totalmente neutros, onde não são afetados pelas intempéries do ambiente (ALZATE-MARIN, 2005).

Cada marcador possui vantagens e desvantagens e sua utilização dependerá entre outros fatores da importância e a finalidade de estudos e a infraestrutura que estará disponível para uso. As ferramentas necessárias para a realização de tal trabalho deve estar totalmente disponibilizadas, toda infraestrutura e os recursos financeiros necessários. O nível de conhecimento de genética molecular dos profissionais que estão ligados diretamente ao projeto, também é um dos grandes diferenciais para atingir o sucesso do experimento (FALEIROS, 2007).

Trabalhando com matéria prima nacional, com intuito de amenizar os impactos de importação dos marcadores moleculares, tanto nos custos quanto no tempo de entrega, que muitas vezes ficam um tempo alto parado para conferência e liberação na Alfandega. Desde o final de 2019, com a oscilação de economia mundial, a dificuldade de importação se tornou ainda maior, devido à falta de insumos par exportar, a demanda de oferta e procura vem tornando cada vez mais inviável a compra dessas matérias-primas no exterior, levando as empresas a optarem por estudos de métodos mais acessíveis, seguros, analíticos e objetivos.

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1. Cultura do milho e sua expansão no Brasil

Milho e soja representam aproximadamente 80% da produção nacional de grãos. Diferentemente da soja que possui características de *commodity* no mercado internacional, o milho tem um enfoque voltado ao abastecimento do mercado interno. Contudo, recentemente observa-se um aumento nas exportações de milho, o que ajuda a sustentar o preço do cereal. A importância do milho também aumentou com sua introdução como cultura de inverno (“safrinha”, segunda safra). Em algumas regiões produtoras, ele substituiu a produção de trigo nesta época. As necessidades técnicas de rotação de culturas para implementação do sistema de plantio direto foi um dos fatores que contribuíram para esta mudança de comportamento dos produtores. Outro fator foi o aumento da demanda do grão no período de entressafra, o que contribuía para uma instabilidade dos preços (DUARTE et al., 2011).

Durante muitos anos, a cultura do milho, de modo geral, passou por um período de estagnação. Não se via incrementos de área produtiva, tecnologias e produtividade. Sua produção ainda era vista como complementar, acessório. Porém, a situação começou a mudar drasticamente por meio da motivação gerada pela competitividade em um âmbito global. Foi daí que surgiu a necessidade de se investir substancialmente em programas de melhoramento com o objetivo de gerar híbridos cada vez mais responsivos ao uso de tecnologias. Foi uma atuação de forma conjunta com o início de um melhor acompanhamento das lavouras, maior geração e acessibilidade a informações técnicas. Tudo isso conjuntamente à criação de novas tecnologias (PEIXOTO, 2014).

Tecnologias essas que obtiveram um resultado expressamente significativo, com os programas de melhoramento genético, adotando a utilização das técnicas tradicionais da genética convencional, em conjunto com as recentes tecnologias no campo da biologia molecular, trabalho esse que tem por objetivo atender o desenvolvimento de cultivares de milho com características específicas, voltadas para atender as novas exigências do produtor, tanto quanto da indústria e também do consumidor (EMBRAPA, 2004).

Conseqüentemente, a cultura do milho foi uma das que mais se desenvolveu tecnologicamente alcançando patamares superiores de produtividade. Mas um fato importante a se destacar é que, a média nacional ainda enfrenta dificuldades para se elevar mais expressivamente devido ao fato de ainda existirem regiões em que a geração e absorção de tecnologias são concentradas. É possível ainda observar um contraste no uso de tecnologias ao analisar o mapa produtivo nacional. A disseminação de forma mais efetiva dos novos materiais, sejam eles técnicos ou genéticos, contribuiriam para um crescimento mais homogêneo da produção no cenário nacional (PEIXOTO, 2014).

2.1.1. Importâncias socioeconômicas do milho

O milho é uma das culturas agrícolas de maior importância em âmbito global não só no que diz respeito à alimentação humana e animal, mas possui uma boa relevância como fonte de biocombustíveis e insumos para as indústrias desse segmento.

Na safra 2021/22 a produção mundial do cereal foi de aproximadamente 1,19 bilhão de toneladas em uma área total aproximada de 208 milhões de hectares, que o torna um dos cultivos mais difundidos em todo o planeta (BOUCHET et al., 2013; UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA, 2022).

Atualmente, o Brasil ocupa uma posição de extrema importância na produção mundial, o terceiro lugar. A produção nessa temporada chegou ao marco de 118 milhões de toneladas com uma área cultivada aproximada de 21 milhões de hectares, a frente estão os Estados Unidos e China. A produtividade brasileira no ano agrícola de 2021/22 ficou em 5687 kg ha⁻¹ para primeira safra e 4050 kg ha⁻¹ atingidos na segunda safra (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2022).

No Brasil, a instalação da cultura do milho caracteriza uma divisão em duas épocas de plantio. Sendo, o cultivo denominado como verão, que popularmente é chamado de “Primeira Safra”, realizada na época tradicional, ou seja, entre os meses de agosto e novembro, auxiliados pelos estudos do Zoneamento agrícola, indicando a melhor fase de plantio para o melhor aproveitamento do período chuvoso. Na última década, foi consolidada a produtividade que é obtida na “Segunda Safra”, popularmente chamada de “Safrinha”. A Segunda Safra é destinada ao milho em sequeiro e com a instalação de plantio entre meses de janeiro a março. Os estados do Sul e Sudeste saem à frente quanto à produção, chegando a 26 milhões de toneladas aproximadamente, em torno de 70% da produção nacional. Entretanto, na Safrinha, os estados do Centro- Oeste e Paraná já conseguem um número muito mais expressivo, aproximadamente 70 milhões de toneladas, sendo donos de 85% da produção nacional. (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA – EMBRAPA, 2010).

2.1.2. Programa de melhoramento genético no milho

Segundo Fehr (1987), o melhoramento é a arte e a ciência de promover com eficiência o melhoramento genético de plantas. Porém, antes mesmo das pesquisas realizadas por Mendel e Fisher, tanto quanto várias outras nesse seguimento, o melhoramento era realizado como “arte”, por meio da habilidade visual dos ancestrais na escolha das melhores plantas para os próximos plantios.

O milho tem sido o carro chefe nos programas de melhoramento genético, onde o foco além da resistência a pragas e doenças conta também com as melhorias no porte de planta (altura e quantidade de matéria orgânica), produtividade, tamanho e peso de grãos. O desafio vem sendo cada vez maior, principalmente nos estudos de cultivares resistentes as altas temperaturas e a escassez de água. Em razão das tendências futuras as cultivares modernas deverão obter mudanças substanciais, principalmente maiores teores de óleos e proteínas (MIRANDA et al., 2008).

No Brasil o primeiro trabalho visando a produção de milho híbrido foi conduzido no IAC - Instituto Agrônomo de Campinas. No início do século XX, diversos programas de melhoramento genético usando bases científicas foram iniciados. O desenvolvimento de linhas puras, ou linhagens, resultantes do processo de autofecundação das plantas de milho por várias gerações do vigor híbrido, ou heterose, foram os grandes responsáveis pelo impulso do melhoramento genético (SILVA et al., 2006).

Gladstone Almeida Drummond e Antônio Secundino deram início às pesquisas na cultura do milho na Universidade Federal de Viçosa em 1935. Após três anos de estudos, em 1938, é lançada para a área comercial o primeiro híbrido, para esse grande feito, foi cruzado as variedades Cateto e Amarelão (PATERNIANI; CAMPO, 1999).

Com o surgimento do milho híbrido na década de 1920, denotou um grande impulso a agricultura que conhecemos atualmente. Com o surgimento dos híbridos voltados a produção comercial por volta da década de 30, as variedades que possuíam polinização sem controle, foram sendo substituídas paulatinamente. E com isso, a substituição dessas variedades pelo milho híbrido ocuparam cada vez mais espaço no mercado ao final da década de 30, sendo os Estados Unidos o país com maior número de áreas implementadas com essa cultura, chegando a 75%, com uma crescente atingindo 95% na década de 60 (PATERNIANI; VIÉGAS, 1987; BUENO; MENDES; CARVALHO, 2001).

Borém et al. (2013) ressaltaram que o aumento na produção de milho nos últimos tempos, pode ser atribuído, além das práticas culturais, a união de grandes esforços acontecidos na área das pesquisas voltadas ao melhoramento. Podemos destacar entre os feitos mais significativos a evolução de cultivares tolerante aos estresses abióticos, sendo o mais importante deles a seca, como também cultivares capazes de tolerar as doenças e pragas que acometem a cultura. Em função disso, houve mudanças consideráveis em âmbito morfológico e fisiológico que foram capazes de elevar a eficácia no crescimento, com intuito de aumentar a matéria orgânica, com isso gerando o desenvolvimento e partição dos fotoassimilados das plantas.

Já Andorf et al. (2019) afirmaram que o programa de melhoramento genético contribuiu de uma forma expressiva quanto a produtividade, desde a década de 60, com um incremento de 3800 kg ha⁻¹ que segundo Santos (2016), apesar dos números conhecidos, ainda não está disponível as informações que seriam de suma importância que se refere sobre o percentual dos fatores tanto genético quanto ambiental, que denotem os responsáveis pelo aumento, haja vista que, o programa de melhoramento genético, por sua vez e associado as inovações que são implementadas ao manejo, são fundamentais para obter-se o sucesso na produtividade.

O grande desenvolvimento que houve no agronegócio no território brasileiro, pode se inferir que é grandemente devido a expressiva contribuição do melhoramento genético disposto com a tecnologia do milho híbrido (VENCOVSKY; RAMALHO, 2000), resultando que grande parte das áreas de cultivos são implementadas por milho híbrido (MASUKA et al. 2017).

2.2. Marcadores moleculares

Devido à necessidade da detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA, surgiram os marcadores moleculares. Sua definição se dá por qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA. Ou também, como sendo características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente. Por serem, geralmente herdadas co-dominantemente, os marcadores moleculares exibem neutralidade fenotípica e raramente apresentam interações epistáticas ou pleiotrópicas, portanto podem ser detectados tanto em tecidos jovens quanto em tecidos adultos (EMBRAPA, 2004).

O marcador de DNA teve seu início no melhoramento de plantas no começo da década de 80. No início, os usos dos marcadores eram bastante limitados, não se tinha conhecimento da real capacidade de gerações de informações seguras oriundas dos marcadores moleculares, muito menos profissionais capacitados e qualificados. Como também a imensa dificuldade de encontrar incentivos financeiros (RIBAUT et al., 2010).

O uso dos marcadores moleculares possibilita que as seleções de novos cruzamentos sejam realizadas em uma mesma geração. Isto aumenta significativamente a eficiência de um programa de melhoramento genético, mesmo que não tenham sido mapeados. Esta técnica tem sido bastante utilizada para sinalização de genes de resistência a doenças, insetos e pragas, assim como para a avaliação e caracterização de germoplasma, melhoramento dos pais de híbridos, introgressão gênica e seleção auxiliada por marcadores, desenvolvimento de mapas genéticos, determinação de grupos heteróticos e associação com regiões genômicas que afetam heterose, reconstituição de pedigrees, teste de pureza genética, seleção de resistência a patógenos exóticos, associação com caracteres quantitativos, estudos de interação genótipo-ambiente, processos legais, dentre outros (RAMALHO; LAMBERT, 2004).

Hoje, o que ainda dificulta a utilização da técnica dos marcadores moleculares nos programas de melhoramento genético é o custo para implantação e a necessidade de procedimentos elaborados, de modo que novos tipos de marcadores estão aparecendo para dar novas perspectivas para a seleção assistida (RAMALHO; LAMBERT, 2004).

As inovações utilizadas com uso das tecnologias de sequenciamento de DNA estão se tornando cada vez mais rápidos e com o custo mais acessível, ao processo de análise de locos de características quantitativas (QTLs) e abordagens na seleção assistida por marcadores. Em função disso, o uso de marcadores moleculares nos programas de melhoramento genético, tem por objetivo acelerar e melhorar a sua precisão (FRANCIA et al., 2004; BOOPATHI et.al., 2013; RASMUSSEN et al.,2014).

2.3. Conceitos da técnica do marcador molecular SNP

Os SNP são marcadores moleculares utilizados na detecção e identificação das mutações e polimorfismo, tendo por base a região e a posição de um único nucleotídeo. Os polimorfismos são considerados fontes abundantes de variações genéticas que são obtidos por eventos lacônicos, ou seja, inserção ou deleção. Essa técnica também permite que se obtenha com qualidade todo mapeamento genético, tanto quanto as informações na diferenciação dos alelos alocados no mesmo gene (MELLOTO; KELLY, 2001; QUIRINO, 2003).

Os marcadores moleculares SNP tem como base as alterações mais elementares da molécula de DNA, ou seja, mutações em bases únicas da cadeia de bases nitrogenadas, denominadas por: Adenina, Citosina, Timina e Guanina. Os estudos mostram que as mutações mais comuns são as transições, onde ocorrem trocas de uma purina por outra purina ($A = G$) ou de uma pirimidina por outra pirimidina ($C = T$). Menos frequentes, as transversões ocorrem quando há troca de uma purina por uma pirimidina, ou vice-versa ($C/T = A/G$). Habitualmente, os marcadores SNP são bi-alélicos, ou seja, geralmente são encontradas apenas duas variantes em uma espécie, podemos citar como exemplo, um alelo coincide a um par de bases $A = T$ e o outro a um $G = C$. Os SNPs podem ocorrer em regiões codificadoras ou com função regulatória, entretanto, na maior parte das vezes são encontrados em espaços intergênicos, sem função determinada (LI et al., 2009).

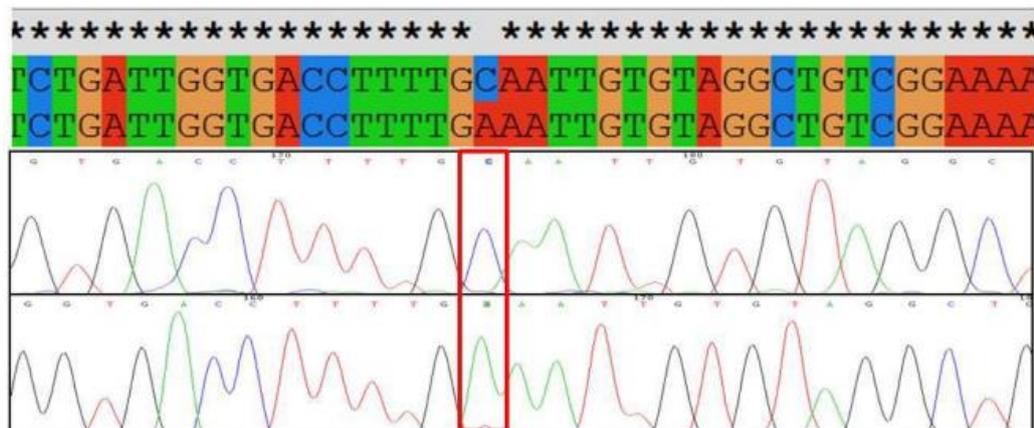
Os SNPs são os marcadores com mais frequência de variação que se encontra no DNA. A frequência encontrada para os genomas nos programas de melhoramento é de 100-300 pb para cada SNP. Entretanto, ressalte-se que devido a essa alta frequência que ocorre nos genomas, os marcadores SNPs, possui uma ampla fonte de variabilidade que por sua vez, podem ser utilizados na saturação dos mapas genéticos (BROOKES, 1999).

Contudo, os SNPs são atribuídos pelas ocorrências das variações genéticas determinadas em um único par de base em um locus, quando dois alelos possuem a frequência acima de 1% em uma determinada população implantada ao acaso. Nas implantações de populações que a

frequência atingida seja inferior a 1%, é considerada como mutação (BUTLER, 2005; CARVALHO, 2010).

Na figura a seguir podemos observar uma representação de uma sequência do marcador molecular SNP:

Figura 1: Representação de uma sequência de SNP. Tal sequência se difere apenas por ter um único par de bases. Podemos verificar que o polimorfismo se dá por C = T.



Fonte: Adaptação realizada de Pinheiro, 2010.

2.3.1. Aplicação do marcador molecular SNP

Uma das grandes vantagens empregadas ao uso dos marcadores moleculares SNP para seleção assistida, é fácil conversão dos ensaios em diferentes plataformas. As tecnologias para o surgimento de novas plataformas de genotipagem de painéis de baixas e médias densidades, são geradas e disponíveis de tempos em tempos e de forma dinâmica. A possibilidade de fácil transferência dos ensaios entre as plataformas aumenta cada vez mais a competição entre as empresas geradoras dessa tecnologia, ocasionando em melhoras recorrentes das tecnologias em curto espaço de tempo e com impacto favorável na redução dos custos (CONSORTIUM, 2009).

Os chips de genotipagem de alta densidade, com milhares de marcadores SNP, trouxeram grandes avanços nos estudos direcionados na identificação de genes que controlam características pontuais de interesse agrônomico e econômico. Anteriormente ao surgimento dessa tecnologia, alguns estudos eram meramente executados com uma média de 150 marcadores microssatélites com espaço médio mínimo de 20cM, tal processo era equivalente à

média de 18 milhões de pares de base. Seguidamente, nas fases subsequentes do projeto, marcadores adicionais precisavam ser adicionados ao mapa com intuito de refinar as regiões de interesse (MATUKUMALLI et al., 2009).

Os ensaios com microssatélites não aceitavam um alto nível de paralelização, ou seja, praticamente apenas 3 a 5 loci poderiam ser genotipados na mesma reação, em função disso, uma mesma amostra tinha a necessidade de ser manuseada inúmeras vezes, elevando as chances de erros laborais. Habitualmente, as fases de geração de dados moleculares se estendem por meses, envolvendo vários profissionais em laboratórios distintos (MATUKUMALLI et al., 2009).

O surgimento dos chips de genotipagem de SNP de alta densidade foram um divisor de águas mudando consideravelmente as práticas e técnicas em relação a execução dos estudos de mapeamentos. As análises de dados são altamente automatizadas e com altos níveis de redundância os erros de genotipagem são reduzidos para índices menores que 0,01%. Todas essas evoluções tornaram possível realizar a fase de geração de dados moleculares de um estudo de mapeamento em dias ao invés de meses (MEUWESSEN et al., 2001).

2.3.2. As vantagens e desvantagens da técnica SNP

A principal vantagem em seu uso, comparando com outras técnicas de seleção assistida, é a capacidade de ser possível a detecção de um grande número de polimorfismo entre os alelos de um gene, baixa mutação, novas abordagens metodológicas, fácil de genotipar, facilidade para os estudos comparados e banco de dados. As desvantagens se dão pela necessidade previa do conhecimento antecipado da sequência do DNA, os custos altos e todas as fases necessárias, são superiores as demais técnicas (MELLOTO; KELLY, 2001; QUIRINO, 2003).

2.4. Análises da utilização da seleção assistida

Os marcadores moleculares são classificados e subdivididos em três grupos principais: hibridação, PCR e por último os sequenciadores. Entretanto, podem ser classificados como dominantes e codominantes a depender de qual será a herança alélica. Os marcadores moleculares classificados como codominante, permitem a diferenciação entre os indivíduos homocigotos dos indivíduos heterocigotos, já os marcadores moleculares classificados como dominante, identificam e classificam apenas a presença ou ausência de um alelo (JACCOUD et al., 2001).

Com o avanço dos estudos as técnicas foram aprimoradas e inovadoras como a hibridação e PCR, que contribuíram de maneira significativa para o aperfeiçoamento dos marcadores genéticos de DNA. Quando se fala em hibridação, corresponde ao pareamento de bases complementares. Esse processo permitiu o largo desenvolvimento das metodologias que necessitam utilizar fragmentos de DNA em partes minúsculas, a exemplo das sondas que identificam o polimorfismo exclusivamente nas sequências homólogas a esta sonda. Outra técnica que se assemelha e pode ser considerado derivado dessa abordagem é a RFLP, que por sua vez, foi o marcador molecular pioneiro, com base em DNA, desenvolvido (BOTSTEIN et al., 1980).

Os marcadores moleculares admitem gerar um volume considerável de informações de suma importância no âmbito da identidade genética da espécie a ser avaliada, tais informações transitam também entre a diversidade e frequência. Os estudos atribuídos em prol desse conhecimento são muito favoráveis para as diferentes estratégias de conservação dos materiais genéticos como a *ex situ*, *in situ* e *on farm*. Para cada estratégia a ser empregada nos estudos específicos, os marcadores assistem de forma efetiva nas diferentes etapas, sejam elas as coletas, manutenção, manejo e na ampliação dos materiais genéticos (PARAN; MICHELMORE, 1993; MEKSEM et al., 2001).

Quando o assunto é seleção assistida, é valiosa a diferenciação daqueles que possam fornecer dados objetivos de um único loco, a exemplo o PCR, ao invés de optar por marcadores que fornecem dados que são gerados por múltipla região genica, a exemplo os RAPD, AFLP e Minissatélites. Tal diferenciação se torna importante principalmente no momento da interpretação de dados, pois o volume de informações em conjunto pode influenciar. Os métodos analíticos tanto quanto a interpretação molecular dispostas requerem um processo de análise multivariada e por sua vez, ficam dependente do tipo de marcador empregado e do objetivo de estudo (AVISE, 1993; HARTL; CLARK, 1989).

2.5. Pureza Varietal

A pureza genética consiste basicamente na identidade de material genético, caracterizada por um conjunto que fornece informações exatas entre as características fenotípicas e genéticas que identificam e separam das demais e conseqüentemente são mantidas para multiplicação de sementes.

A determinação da pureza genética pode ser feita através de características visuais (morfológicas e/ou anatômicas) nas sementes, plântulas ou plantas. Estas características,

entretanto, podem ser influenciadas por fatores ambientais, demandam tempo, e, além disto, há cultivares com características fenotípicas muito próximas. Métodos químicos, físicos e patológicos também têm sido empregados no controle da qualidade genética. Mais recentemente, métodos bioquímicos e moleculares, como a eletroforese de isoenzimas e marcadores de DNA tais como: RAPD ("Random Amplification of Polymorphic DNA"), RFLPs ("Restriction Fragment Length Polymorphisms"), SSR ("Simple Sequence Repeats"), dentre outros, tem sido utilizado também na identificação de cultivares. A utilização destes métodos permite a identificação mais rápida e tem assegurado a identificação das cultivares desenvolvidas por empresas produtoras de sementes (NASCIMENTO; PEREIRA, 2008).

Para a o processo de multiplicação de sementes, é necessário uma série de precauções voltadas à pureza genética, tal processo irá garantir as características de interesse que serão acrescentadas aos materiais comerciais para que sejam mantidas e expressas ao ser implantado no campo. A cultura do milho, grande parte das cultivares que estão dispostas no mercado é híbrida, processo esse obtido pelo cruzamento entre linhagens, momento crucial para garantir que não haja contaminação que ocorre pela autofecundação parental das plantas consideradas fêmeas. Garantir a qualidade genética é importante para que se alcance uma qualidade fisiológica das sementes (VON PINHO et al., 1996).

Para a manutenção a fim de assegurar que não haja contaminação, é necessário um constante monitoramento para garantir que as linhagens implantadas a campo mantenham um alto grau de homozigose, pureza e com isso assegurar que os lotes destinados à comercialização de híbridos mantenham sua integridade. O uso dos marcadores com descritores morfológicos e microssatélites são algumas das técnicas importantes para garantir e verificar a pureza genética, entretanto, o SNP se destaca por sua precisão, mesmo com custo mais elevado. Em função disso, a melhor escolha da técnica de conservação e monitoramento da integridade da cultura vai também depender da situação e a realidade de cada campo de produção (GIANCOLA et al., 2006; RAMOS, 2006). Useche et al. (2001) ressaltaram que os SNPs possuem uma alta aplicação dentro dos processos analíticos de genotipagem a larga escala, principalmente pelo fato de serem amplos e abundantes em relação ao genoma de qualquer espécie em estudo e também por ter sido verificado que, esses marcadores apresentam uma taxa mais lenta de mutação dentro das gerações.

3. OBJETIVOS

Considerando-se a importância da pureza genética e varietal e principalmente buscando condições com custo-benefício atraentes, com dados objetivos oriundos das análises e técnicas moleculares, o objetivo desse trabalho é avaliar marcadores moleculares SNPs, com custo-benefício satisfatórios e que supram a necessidade nos quesitos qualidade e confiabilidade dos dados emitidos.

4. MATERIAIS E MÉTODO

4.1. Instalação do experimento

O projeto compõe em duas fases. No primeiro momento, experimento implantado em casa de ambiente controlado e no segundo momento análises realizadas no Laboratório de Genotipagem da Syngenta. Foi avaliado um híbrido de milho comercial safra 2020/2021, o material utilizado possui tecnologia OGM evento duplo, ou seja, BT11/MIR162, que possui resistência a insetos e ao Glufosinato. A implantação do híbrido avaliado teve as sementes semeadas nas bandejas e as plantas transplantadas nos vasos no mês de setembro/2022. Todo processo de coletas, também teve início no mês de setembro/2022 e finalizou mês de novembro/2022, todo processo ocorreu em um período de 60 dias.

O presente projeto realizou-se nas dependências da estação de pesquisa Syngenta Proteção de Cultivos LTDA, situada na cidade de Uberlândia, Rodovia BR-452, KM 142, localizada na região Sudeste, MG. Posicionada geograficamente nas coordenadas geográficas -18° 43' 41" S de latitude e -48° 17' 58" W de longitude com uma elevação de 946 metros.

Foram utilizadas cem sementes de milho (VIP2) para plantio do híbrido. Inicialmente, as sementes foram distribuídas em bandejas de germinação, preparadas com substratos que possui como matéria prima principal a Casca de Pinus juntamente com os agregantes: fibra de coco, vermiculita, casca de arroz. A casa de vegetação foi preparada com controle de umidade entre 50% e 60% e a temperatura variando entre 25°C e 30°C. Com o material disponível nas bandejas germinativas, não houve a necessidade da realização de tratamentos culturais, apenas irrigação que ocorreu por meio de microaspersores automatizados, que aconteceram duas vezes ao dia, durante trinta dias consecutivos. Passados dez dias pós plantio, as plantas foram transplantadas para vasos de 16 litros de capacidade. Os vasos foram preparados com as mesmas composições utilizadas para o semeio nas bandejas de germinação acrescidas com 8 kg de adubos na

formulação N, P, K (Nitrogênio, Fósforo e Potássio) para um total de 100 vasos. Foram transplantadas apenas uma planta por vaso, com a irrigação programada para ser realizada três vezes por semana via sistema de irrigação automatizado. Nesta fase, também não houve a necessidade de tratos culturais, devido ao fato de o ensaio estar instalado em casa com a fitossanidade controlada e ao tempo de permanência do experimento.

4.2. Realização das coletas

O protocolo vigente, utilizado comercialmente, são coletados quatro discos vegetais apenas em duas fases, uma com dez dias após plantio e a outra em média 50 dias após plantio, para verificação e confirmação de pureza varietal.

Para verificação do objetivo proposto neste trabalho os tratamentos foram constituídos em diferentes idades das plantas, em dias variados e em diferentes quantidades de tecido vegetal coletado, como apresentado na tabela 1. Para cada dia programado para executar as coletas, foram utilizados um total de cinco placas, isto é, correspondendo a cinco repetições de cada tratamento.

Para essa finalidade foram utilizados oito marcadores com primers de matéria prima importada que são implementados e consolidados, denominados como: M817, M820, M827, M831, M842, M847, M850, M853, e foram comparados com outros oito marcadores experimentais com primers de matéria prima nacional, sendo eles denominados como: EXPM01, EXPM02, EXPM03, EXPM04, EXPM05, EXPM06, EXPM07 e EXPM08, para avaliar o comportamento genético de ambos. Num esquema fatorial em delineamento em blocos casualizados.

Tabela 1- Datas e quantidades de coleta de material vegetal da cultura do milho.

Tratamento	Nº de Punches	Dias de coleta após plantio
1	2	11-16-21-30-45-60
2	4	11-16-21-30-45-60
3	6	11-16-21-30-45-60
4	8	11-16-21-30-45-60
5	Parte foliar com 3cm	11-16-21-30-45-60

Fonte: Do autor (2023).

Os processos de coleta dos tecidos vegetais iniciaram nos primeiros onze dias após plantio, acontecendo da seguinte forma: os tecidos vegetais foram coletados na forma de discos vegetais, denominados como *punches*, com diâmetro ± 3 cm cada disco, utilizando um amostrador de coleta específico.

As coletas dos tecidos vegetais aconteceram em diferentes datas e em dias alternados, conforme demonstrado na tabela 1. O material coletado foi mantido no gelo durante todo processo de coleta até a chegada ao laboratório. Os tecidos vegetais foram distribuídos nas placas de 96 poços chamadas de placas Costar.

As coletas foram efetuadas em seis datas distintas. As amostras foram coletadas diretamente em tubos Ependorff, posteriormente alocadas nas placas, devidamente distribuídas e registradas conforme Figura 2.

Figura 2: Mapa de localização de amostras.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	00001	00009	00017	00025	00033	00041	00049	00057	00065	00073	00081	00089
B	00002	00010	00018	00026	00034	00042	00050	00058	00066	00074	00082	00090
C	00003	00011	00019	00027	00035	00043	00051	00059	00067	00075	00083	00091
D	00004	00012	00020	00028	00036	00044	00052	00060	00068	00076	00084	00092
E	00005	00013	00021	00029	00037	00045	00053	00061	00069	00077	00085	00093
F	00006	00014	00022	00030	00038	00046	00054	00062	00070	00078	00086	00094
G	00007	00015	00023	00031	00039	00047	00055	00063	00071	00079	00087	00095
H	00008	00016	00024	00032	00040	00048	00056	00064	00072	00080	00088	00096

Fonte: Do autor (2023).

4.3. Análises moleculares

As placas foram levadas para o Laboratório de Genotipagem da empresa Syngenta e armazenadas em um freezer com temperatura -80°C , cujo intuito foi manter a integridade genética do material coletado, permanecendo no compartimento em média trinta minutos antes de começar os preparos. Logo após esse período, as placas foram retiradas do ultra freezer,

levadas ao liofilizador que teve a permanência de dezesseis horas. Pelo protocolo as amostras devem permanecer no ultra freezer por um tempo mínimo de vinte minutos, caso esse tempo não seja respeitado, as amostras podem desintegrar no processo de liofilização. Já o processo de liofilização, consiste na desidratação do tecido vegetal por meio da variação de temperatura que consiste entre -80°C e 30°C , esse procedimento consta em protocolo que o tempo mínimo para todo processo são de oito horas. Logo após, as placas foram levadas para extração do DNA.

Nessa fase, foi utilizada a metodologia do protocolo adaptado de Dellaporta et al. (1983) para separar as impurezas da solução do sobrenadante. Contudo, o protocolo utilizado para extração do DNA foi criado por Ferreira e Grattapaglia (1998), *apud* Vidal et al. (2003) e adaptado para as condições atuais.

O processo de extração de DNA para análises moleculares com uso de seleção assistida, é importante analisar não somente a quantidade de DNA extraído, mas também a qualidade de DNA. Entretanto, é imprescindível atentar sobre a aquisição de um DNA de qualidade. Todavia, o alcance de DNAs de boa qualidade para a realização das análises moleculares é fundamental, tendo em vista que DNA de má qualidade pode influenciar negativamente em todas as demais etapas subsequentes do processo. Contudo, é importante enfatizar que fase de coleta de material vegetal é primordial para a obtenção do DNA de boa qualidade e com a quantidade satisfatória (AGBAGWA, 2012).

Habitualmente, são usados entre 50 a 100ng de DNA por reação, este intervalo pode variar de acordo com a técnica de marcadores empregada, pois, é diretamente afetada durante o processo de lavagens na fase de extração do DNA (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Segundo Kota (2001) os marcadores moleculares SNPs são considerados os mais adequados para as análises de genotipagem, por possuírem uma abundância e mais estável variação genética na maioria dos genomas dos organismos. Considerando na prática, a alta frequência, os SNPs, é uma das fontes mais ricas e abundantes de variabilidade genética que também podem ser utilizados para a saturação de mapas genéticos e também para associar as informações para que se obtenham os mapeamentos completos das características de interesse.

Para essa finalidade foram utilizados oito marcadores com primers de matéria prima importada que são implementados e consolidados, denominados como: M817, M820, M827, M831, M842, M847, M850, M853, e foram comparados com outros oito marcadores experimentais com primers de matéria prima nacional, sendo eles denominados como: EXPM01, EXPM02, EXPM03, EXPM04, EXPM05, EXPM06, EXPM07 e EXPM08, para avaliar o comportamento genético de ambos. As amostras foram inseridas a avaliação assistida conforme demonstrado na tabela 2:

Tabela 2 - Distribuição das análises assistidas em relação as amostras vegetais

Tratamento	Nº de Punches	Dias de coleta após plantio
EXPM01	2-4-6-8-Parte foliar (3cm)	11-16-21-30-45-60
EXPM02	2-4-6-8-Parte foliar (3cm)	11-16-21-30-45-60
EXPM03	2-4-6-8-Parte foliar (3cm)	11-16-21-30-45-60
EXPM04	2-4-6-8-Parte foliar (3cm)	11-16-21-30-45-60
EXPM05	2-4-6-8-Parte foliar (3cm)	11-16-21-30-45-60
EXPM06	2-4-6-8-Parte foliar (3cm)	11-16-21-30-45-60
EXPM07	2-4-6-8-Parte foliar (3cm)	11-16-21-30-45-60
EXPM08	2-4-6-8-Parte foliar (3cm)	11-16-21-30-45-60
M817	2-4-6-8-Parte foliar (3cm)	11-16-21-30-45-60
M820	2-4-6-8-Parte foliar (3cm)	11-16-21-30-45-60
M827	2-4-6-8-Parte foliar (3cm)	11-16-21-30-45-60
M831	2-4-6-8-Parte foliar (3cm)	11-16-21-30-45-60
M842	2-4-6-8-Parte foliar (3cm)	11-16-21-30-45-60
M847	2-4-6-8-Parte foliar (3cm)	11-16-21-30-45-60
M850	2-4-6-8-Parte foliar (3cm)	11-16-21-30-45-60
M853	2-4-6-8-Parte foliar (3cm)	11-16-21-30-45-60

Fonte: Do autor (2023)

A identificação do polimorfismo se compõe por uma pequena mudança ou variação genética observada na sequência disposta no DNA. Em função disso, os SNPs, se mostraram mais eficientes em tal detecção (BROOKES, 1999).

A extração de DNA dos tecidos foliares, tiveram as reações utilizadas mediante protocolo desenvolvidos e adaptado por Liu et al. (2000).

A reação PCR basicamente obedeceu ao esquema realizado em um volume total de 20µL, contendo 20ng de DNA genômico, 0,15µM de cada “primer”, 200µmol de dNTP, 50mM de KCl, 10mM de Tris-HCl pH 8,3, uma unidade de Taq DNA polimerase. As quantidades de MgCl₂ pode variar para cada par de “primers”, sendo de 2,5 a 3,5mM, conforme descrito para cada primer (LIU et al., 2000).

A amplificação foi realizada em um programa do tipo *touch down* conforme descrito a seguir: inicialmente o DNA foi desnaturado a 95°C por 12 minutos. Seguiram-se 47 ciclos de desnaturação – anelamento - extensão. Nos primeiros 11 ciclos de amplificação, a desnaturação feita a 94°C por 15 segundos; a temperatura de anelamento, no primeiro ciclo de 65°C por 30 segundos, e diminuiu um grau a cada ciclo (*touch down*), chegando a 55°C no décimo primeiro ciclo; a extensão foi de 72°C por 1 minuto. Outros trinta e seis ciclos foram de 94°C por 15 segundos; 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Em seguida ocorreu a extensão final a 72°C por 6 minutos. Após a reação teve a adição de 5ml em solução contendo 0,05% de azul

de bromofenol, 0,05% de xileno cianol, EDTA 10mM e formamida 95%. Os produtos de amplificação foram aquecidos em termociclador a 94°C por 5 minutos. Os fragmentos amplificados foram separados em eletroforese vertical por eletroforese em gel de poliacrilamida. As colorações dos géis

foram feitas com prata segundo metodologia descrita por Creste et al. (2001), protocolo descrito acima foi adaptado para utilização dos recursos de maior interesse e objetividade.

Após todo esse processo, as amostras foram levadas para o Arraya, um equipamento que tem como finalidade a leitura dos gerados por fluorescência emitida pela PCR. Os dados são gerados através da leitura por fluorescência que dão origem aos clusters.

Atualmente, um primer com 30 ml chega a custar em média R\$35.000,00 mais os tributos de importação que podem chegar a 70% do valor bruto. A economia total dos valores dos insumos nacionais chega a ser de 37% menor além de não existir os prazos de liberação da alfandega e o tempo de entrega dos primers, que já é altamente vantajoso.

4.4. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados no programa estatístico específico desenvolvido pela própria empresa para as análises desses *clusters* chamado “Magenta”. O programa avalia as purezas das amostras em junção dos marcadores, os resultados das análises estatísticas revelam os dados de pureza das amostras em porcentagem de zero, isso demonstra que as amostras acometidas a essas porcentagens amplificaram e representaram a característica do evento de interesse. Cada clusters possui um valor que é emitido pelo algoritmo a cada amostra não amplificada, ou seja, a amostra que apresenta um resultado diferente de zero, pode ser classificada como impureza ou dado perdido.

Após a avaliação dos clusters, os dados foram submetidos a análise de variância. As análises individuais para o delineamento em blocos casualizados foram realizadas obedecendo ao modelo estatístico abaixo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + D_k + (B/P) / D_{jkm} + TP_{ij} + TD_{ik} + PD_{jk} + TPD_{ijk} + \xi_{ijkm}$$

Em que:

Y_{ijk} : observação avaliada no i-ésimo marcador, no j-ésimo puncher, no k-ésimo dia de coleta, no m-ésimo bloco.

μ : média geral.

T_i ; P_j e D_k : efeito de marcadores, punches e dias de coleta, respectivamente.

TP_{ij} ; TD_{ik} e PD_{jk} : efeitos das interações de primeira ordem entre marcadores e punches, marcadores e dias de coleta e de punches e dias de coleta, respectivamente.

TPD_{ijk} : efeito da interação tripla entre marcadores, punches e dias de coleta.

$(B/P)/D_{jkm}$: efeito de blocos dentro de punches e dias de coleta.

ξ_{ijkm} : erro aleatório.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados gerados em função da fluorescência emitida através da PCR deram origem aos *clusters* que foram analisados especificamente com os Marcadores Moleculares de pureza genética selecionados, analisando estreitamente os alelos de interesse. Tais alelos, deram origem a ligação genética esperada para a análise em questão. Os marcadores de pureza genética apenas amplificam dados obtidos, quando o DNA fornecido encontra-se com quantidade e qualidade suficiente para amplificação, que o aceitável para pureza seria zero, indicando que não há impureza, qualquer resultado diferente o dado não é considerado.

As amostras foram comparadas com os parentais recorrentes de interesse, onde os *clusters* foram agrupados pela presença ou ausência da característica esperada, dessa forma, foram analisados os valores correspondentes a cada dado gerado.

Portanto, nas análises realizadas com os tecidos vegetais coletados aos onze dias após plantio, não foram constatadas diferenças significativas entre os tratamentos (marcadores experimentais e consolidados), sendo que, para o marcador EXPM04 houve uma falha de amplificação de 58,3% na amostra 6 punches, no marcador EXPM08 na amostra 2 punches de 8,3%, no M817 uma falha de 8,3% na amostra 4 punches e no marcador M827 houve uma falha na amostra parte foliar em 16,7%, como demonstrado na tabela 3.

Tabela 3 – Análises moleculares referente as coletas de tecido vegetal realizada aos onze dias pós plantio.

MARCADORES	QUANTIDADE DE TECIDO VEGETAL (DISCOS VEGETAIS)				PARTE FOLIAR
	2	4	6	8	
EXPM01	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM02	0,0%	0,0%	0,3%	0,0%	0,0%
EXPM03	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM04	0,0%	0,0%	58,3%	0,0%	0,0%
EXPM05	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM06	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM07	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM08	8,3%	0,0%	0,0%	0,0%	0,3%
M817	0,0%	8,3%	0,0%	0,0%	0,0%
M820	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M827	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	16,7%
M831	0,0%	0,4%	0,0%	0,0%	0,0%
M842	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M847	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M850	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M853	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%

Fonte: Do autor (2023).

As análises realizadas com os tecidos vegetais coletados aos dezesseis dias após plantio, houve algumas amostras não amplificadas, os marcadores moleculares, EXPM01 na amostra com dois punches em 33,3 e também na parte foliar em 8,3%, EXPM08 na amostra quatro punches em 8,3%, M827 na amostra de parte foliar em 83,3% e M847 na amostra de seis punches em 16,7%. Por sua vez, os resultados não diferem de maneira significativa entre os tratamentos (marcadores experimentais e consolidados), como demonstrado na tabela 4.

Tabela 4 – Análises moleculares referente as coletas de tecido vegetal realizada aos dezesseis dias pós plantio.

MARCADORES	QUANTIDADE DE TECIDO VEGETAL (DISCOS VEGETAIS)				PARTE FOLIAR
	2	4	6	8	
EXPM01	33,3%	0,0%	0,0%	0,0%	8,3%
EXPM02	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM03	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM04	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM05	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM07	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM08	0,0%	8,3%	0,0%	0,0%	0,0%
M817	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M820	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M827	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	83,3%
M831	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M842	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M847	0,0%	0,0%	16,7%	0,0%	0,0%
M850	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M853	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%

Fonte: Do autor (2023).

As análises realizadas com os tecidos vegetais que foram coletadas aos vinte e um dia após plantio, houve uma perda considerável dentro as mostras submetidas as análises. O marcador EXPM02 revelou uma perda de 8,3% na amostra com quatro punches, o marcador EXPM06 sofreu uma perda de 83,3% na amostra com dois punches e também na parte foliar, o marcador M820 demonstrou uma perda de 33,3% na amostra com oito punches e o marcador 853 com uma perda na amostra de oito punches de 8,3%. No entanto, não foram constatadas diferenças significativas entre os tratamentos (marcadores experimentais e consolidados) como demonstrado na tabela 5.

Tabela 5 – Análises moleculares referente as coletas de tecido vegetal realizada aos vinte e um dia pós plantio.

MARCADORES	QUANTIDADE DE TECIDO VEGETAL (DISCOS VEGETAIS)				PARTE FOLIAR
	2	4	6	8	
EXPM01	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM02	0,0%	8,3%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM03	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM04	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM05	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM06	83,3%	0,0%	0,0%	0,0%	8,3%
EXPM07	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM08	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M817	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M820	0,0%	0,0%	0,0%	33,3%	0,0%
M827	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M831	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M842	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M847	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M850	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M853	0,0%	0,0%	0,0%	8,3%	0,0%

Fonte: Do autor (2023).

Com as análises realizadas com os tecidos vegetais coletados aos trinta dias após plantio, pode ser observado uma perda maior em alguns materiais genéticos. De toda forma, as perdas mesmo com um volume mais acentuado foi possível constatar que, não houve diferenças significativas entre os tratamentos (marcadores experimentais e consolidados). Os marcadores que não houve uma amplificação satisfatória foram: EXPM01 na amostra com oito punches em 58,3%, EXPM04 na amostra com seis punches em 75,0%, EXPM08 na amostra com quatro punches em 58,3% e na parte foliar em 75,0%, M827 na amostra seis punches em 8,3%, M831 na amostra com oito punches em 8,3% e M850 na amostra com dois punches em 8,3%, como demonstrado na tabela 6.

Tabela 6 – Análises moleculares referente as coletas de tecido vegetal realizada aos trinta dias pós plantio.

MARCADORES	QUANTIDADE DE TECIDO VEGETAL (DISCOS VEGETAIS)				PARTE FOLIAR
	2	4	6	8	
EXPM01	0,0%	0,0%	0,0%	58,3%	0,0%
EXPM02	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM03	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM04	0,0%	0,0%	75,0%	0,0%	0,0%
EXPM05	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM06	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM07	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM08	0,0%	58,3%	0,0%	0,0%	75,0%
M817	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M820	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M827	0,0%	0,0%	8,3%	0,0%	0,0%
M831	0,0%	0,0%	0,0%	8,3%	0,0%
M842	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M847	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M850	8,3%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M853	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%

Fonte: Do autor (2023).

Nas análises que correspondem o material genético vegetal coletado aos quarenta e cinco dias após plantio, não foram constatadas diferenças significativas entre os tratamentos (marcadores experimentais e consolidados), entretanto, em alguns marcadores moleculares não houve uma amplificação completa e mesmo com um valor expressivo de falta de amplificação, as amostras demonstram um comportamento favorável entre os tratamentos, em função disso, a margem de amostras perdidas não comprometem as análises, os marcadores são: EXPM01 na amostra com seis punches em 58,3% e na parte foliar em 33,3%, EXPM07 na amostra de seis punches em 8,3% e M817 na amostra com dois punches em 8,3%, como demonstrado na tabela 7.

Tabela 7 – Análises moleculares referente as coletas de tecido vegetal realizada aos quarenta e cinco dias pós plantio.

MARCADORES	QUANTIDADE DE TECIDO VEGETAL (DISCOS VEGETAIS)				PARTE FOLIAR
	2	4	6	8	
EXPM01	0,0%	0,0%	58,3%	0,0%	33,3%
EXPM02	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM03	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM04	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM05	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM06	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM07	0,0%	0,0%	8,3%	0,0%	0,0%
EXPM08	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M817	8,3%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M820	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M827	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M831	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M842	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M847	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M850	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M853	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%

Fonte: Do autor (2023).

Como observado na tabela 8, as amostras de tecido vegetal coletadas aos sessenta dias submetidas as análises, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (marcadores experimentais e consolidados). Entretanto, foi observado que algumas amostras, os marcadores moleculares não amplificaram completamente, mesmo não causando impacto negativo significativo nos dados imputados para as análises, são eles: EXPM04 na amostra com quatro punches em 8,3%, EXPM08 na amostra com dois punches em 50,0%, M847 na amostra com oito punches em 8,3%.

Tabela 8 – Análises moleculares referente as coletas de tecido vegetal realizada aos sessenta dias pós plantio.

MARCADORES	QUANTIDADE DE TECIDO VEGETAL (DISCOS VEGETAIS)				PARTE FOLIAR
	2	4	6	8	
EXPM01	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM02	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM03	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM04	0,0%	8,3%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM05	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM06	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM07	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
EXPM08	50,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M817	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M820	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M827	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M831	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M842	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M847	0,0%	0,0%	0,0%	8,3%	0,0%
M850	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
M853	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%

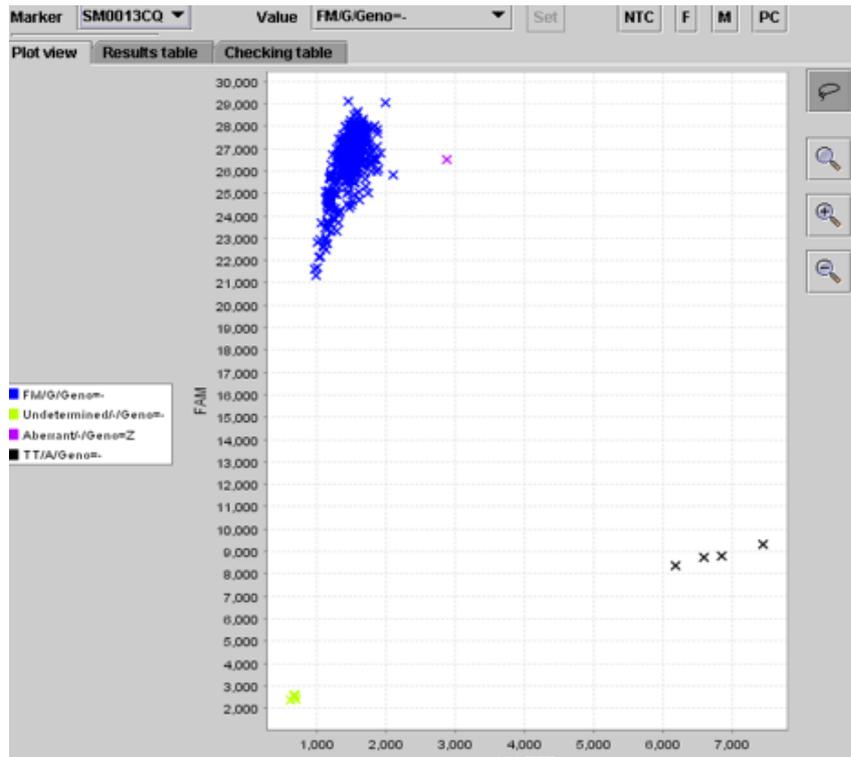
Fonte: Do autor (2023).

O uso das técnicas de clusterização, permite agrupar todos os dados similares, que se torna uma grande vantagem. Pode-se descrever de maneira mais objetiva e eficaz as características consideradas mais peculiares a cada um dos grupos que foram identificados. Tal processo, garante um maior entendimento do conjunto de forma mais ampla de dados original, facilita a evolução dos esquemas de classificação de novos dados e verificar alguma correlação interessante que são originados entre os atributos dos dados que não apresentariam maior facilidade de visualização sem o emprego de tais técnicas.

Entretanto, de maneira alternativa, a clusterização possui potencial de uso como uma das etapas de pré-processamento para outros algoritmos, tais como caracterização e classificação, que exerceriam força trabalhando nos clusters identificados (BELTRAME et al., 2010).

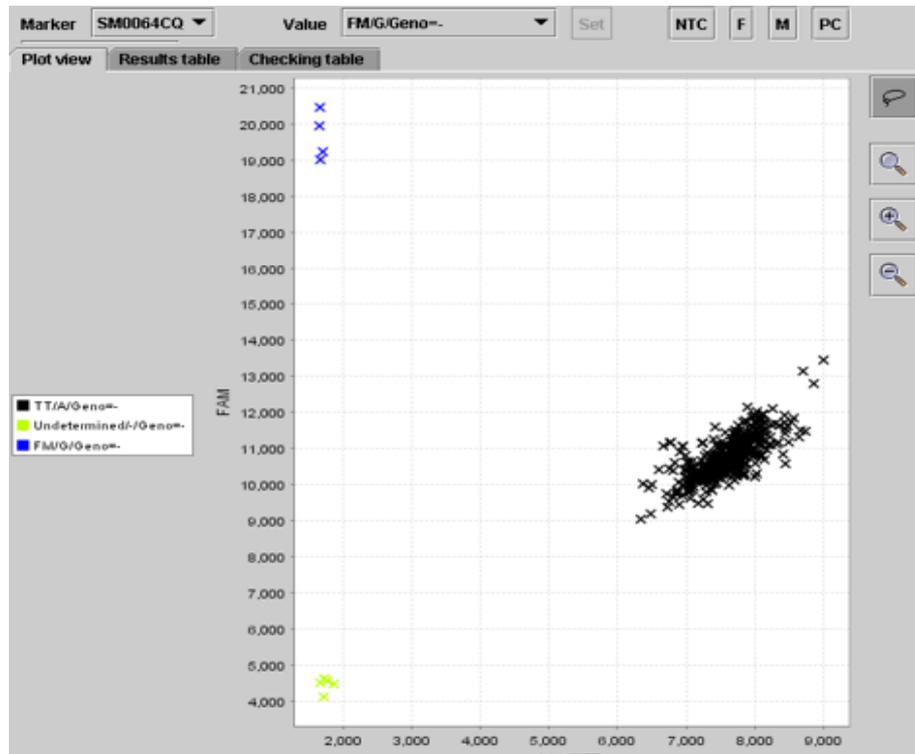
As representações da distribuição dos cluster em relação a cada marcador observado na presente pesquisa, são apresentadas pela seguinte forma:

Figura 3: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador M817.



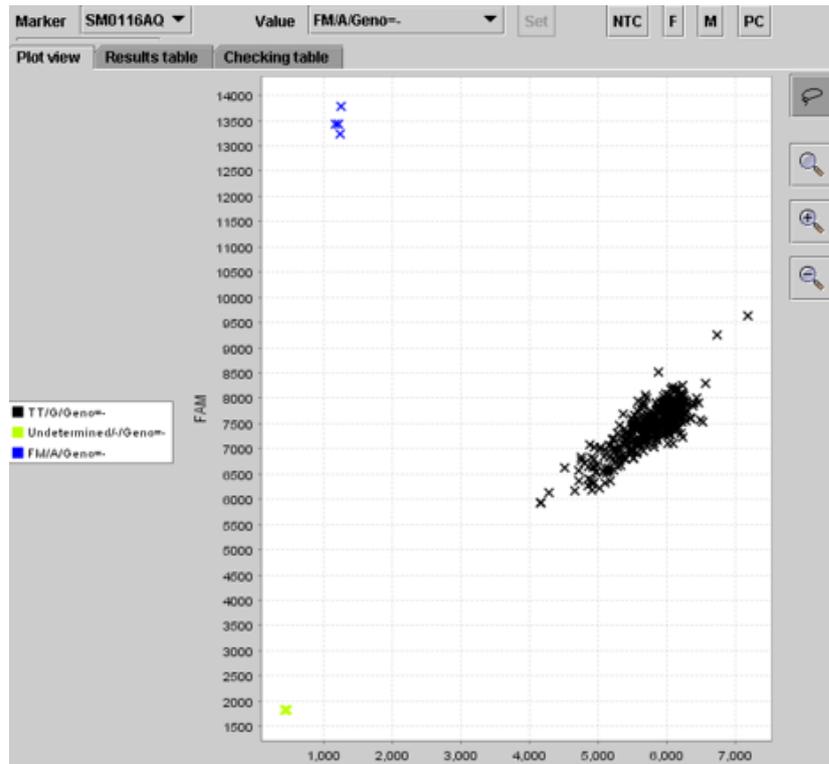
Fonte: Do autor (2023).

Figura 4: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador EXPM01.



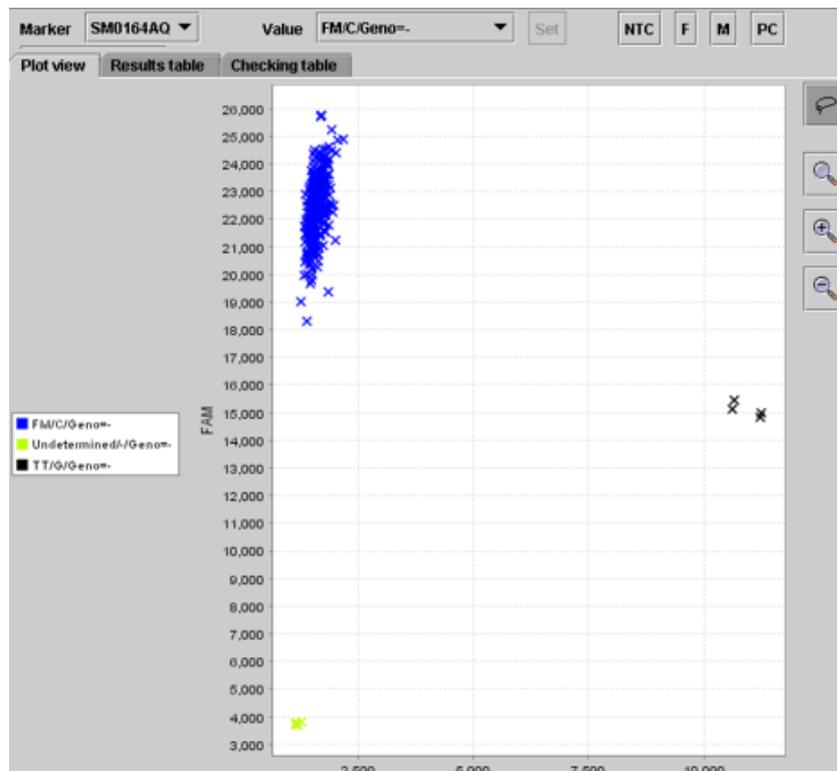
Fonte: Do autor (2023).

Figura 5: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador M820.



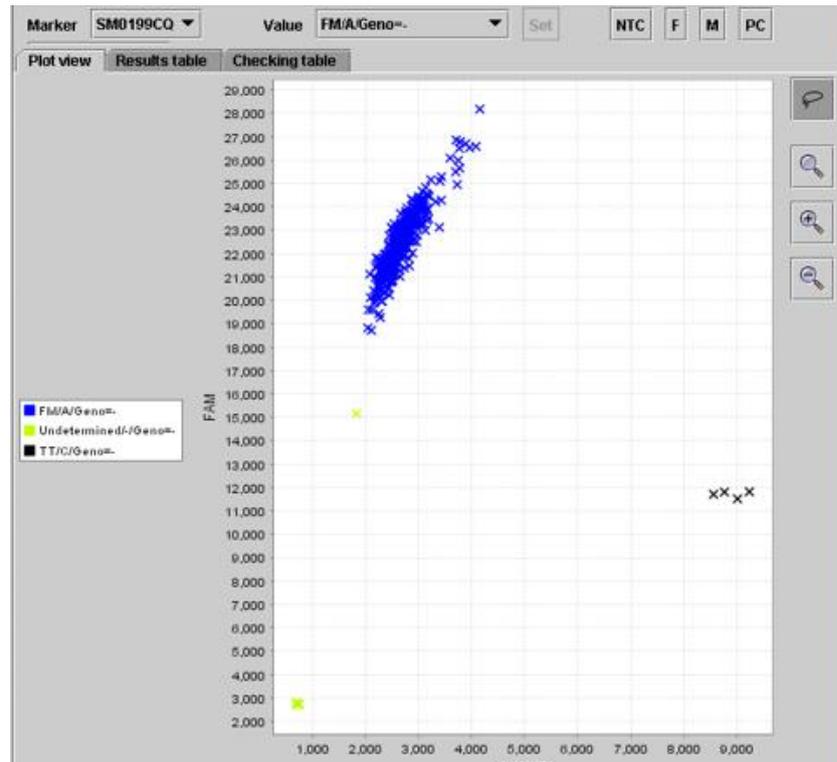
Fonte: Do autor (2023).

Figura 6: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador EXPM02.



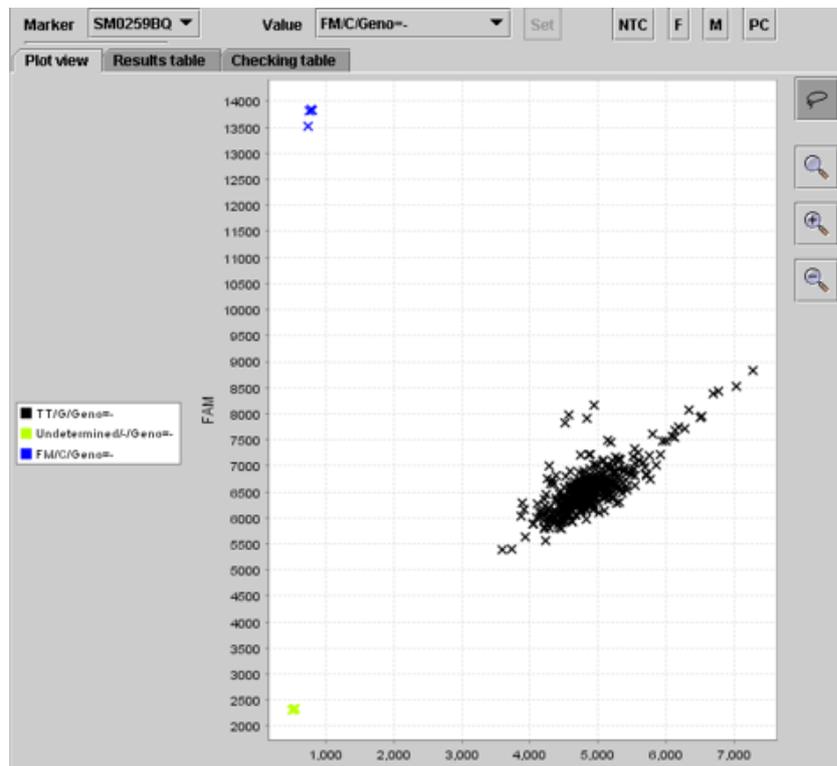
Fonte: Do autor (2023).

Figura 7: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador M827.



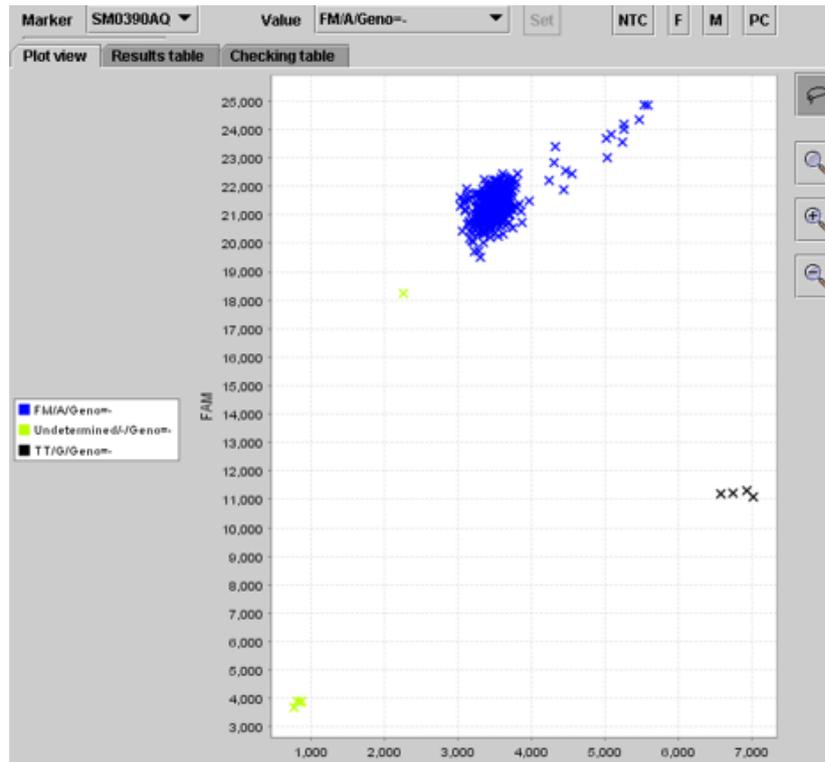
Fonte: Do autor (2023).

Figura 8: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador EXP03.



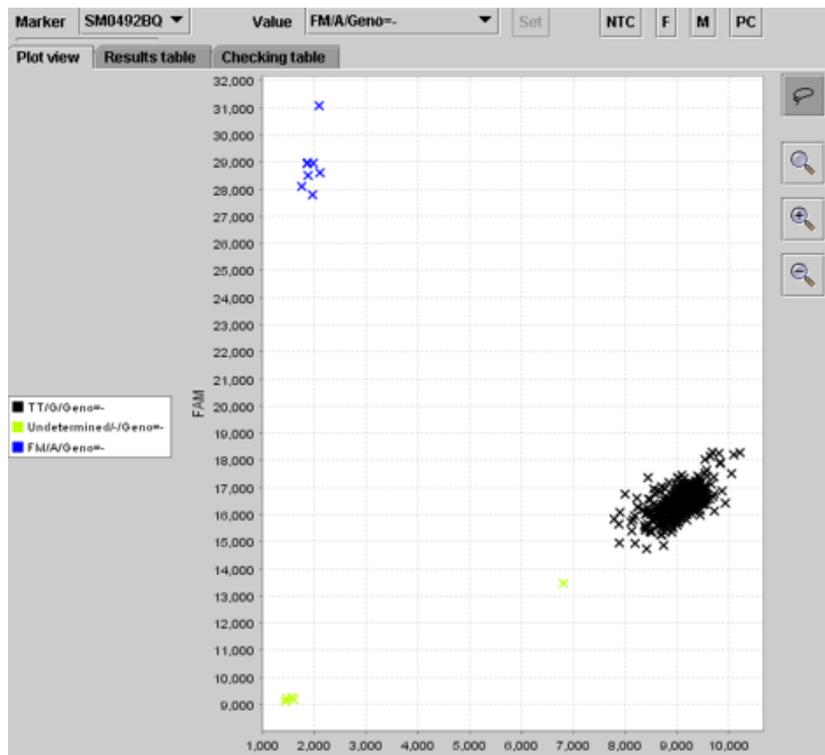
Fonte: Do autor (2023).

Figura 9: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador M831.



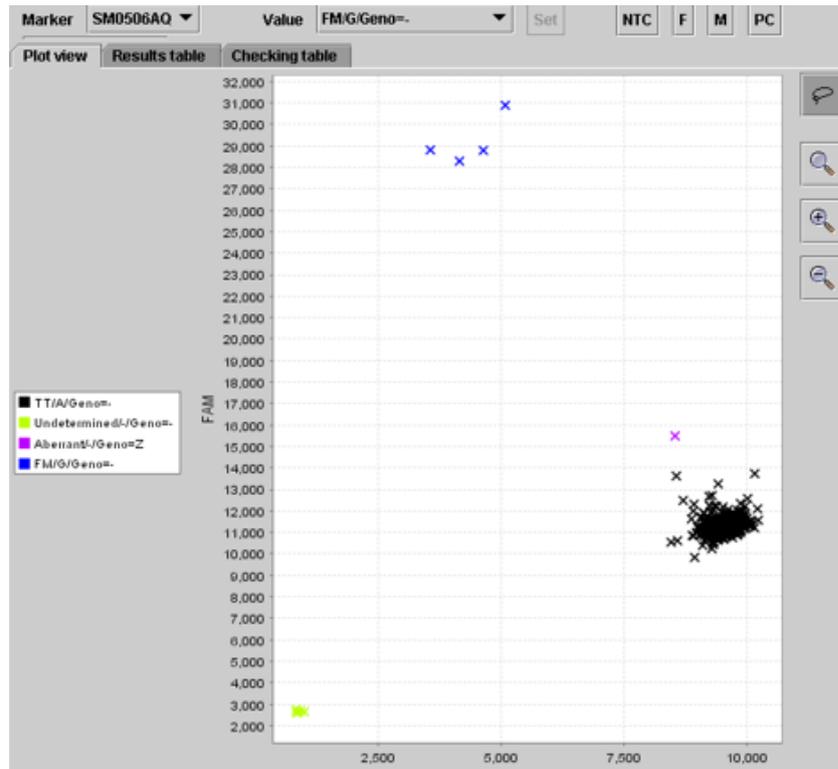
Fonte: Do autor (2023).

Figura 10: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador EXPM04.



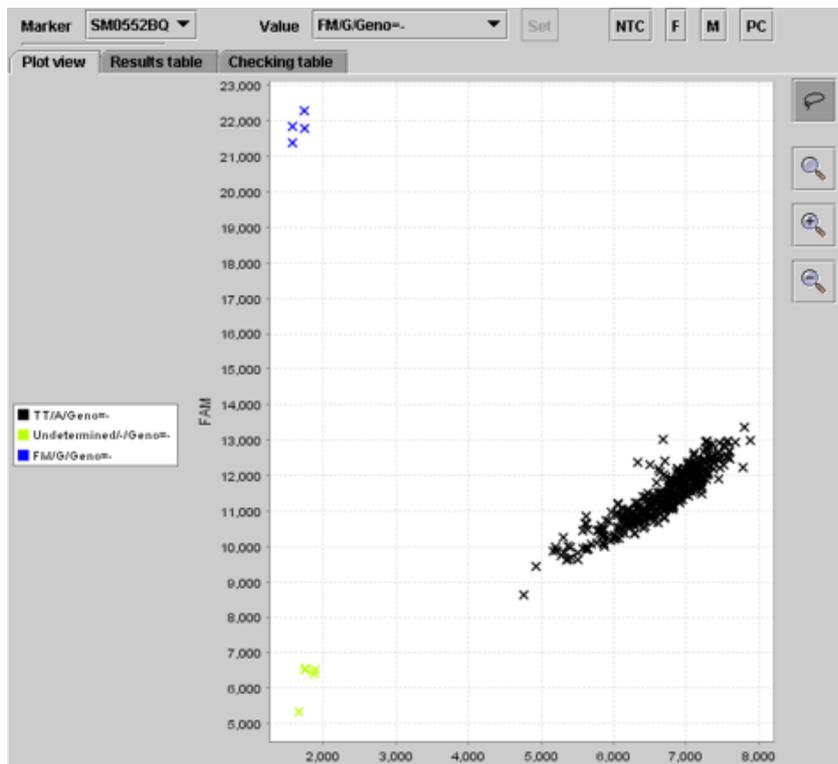
Fonte: Do autor (2023).

Figura 11: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador M842.



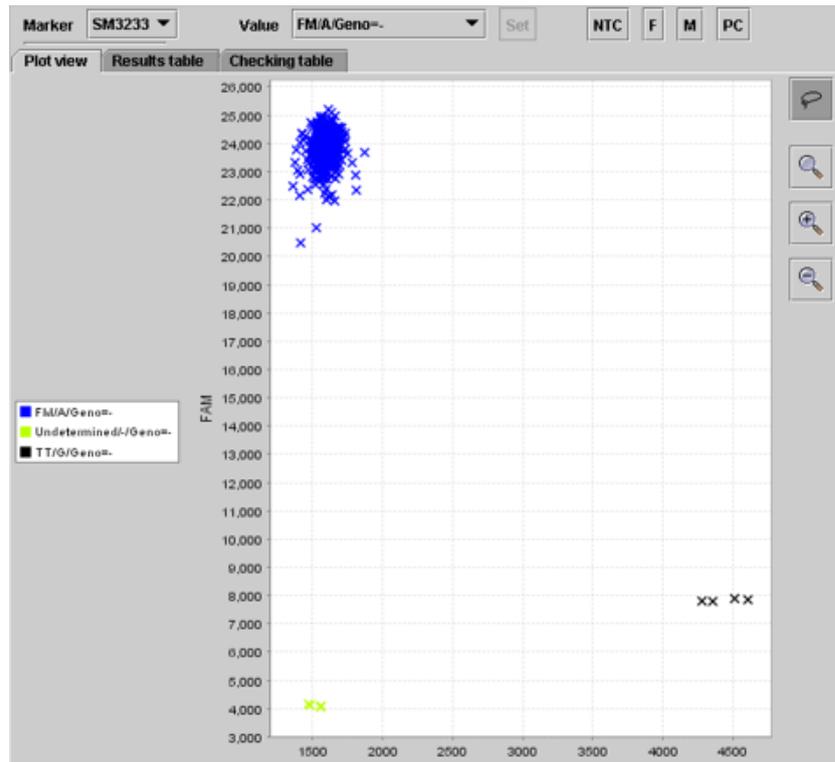
Fonte: Próprio autor (2023).

Figura 12: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador EXPM05.



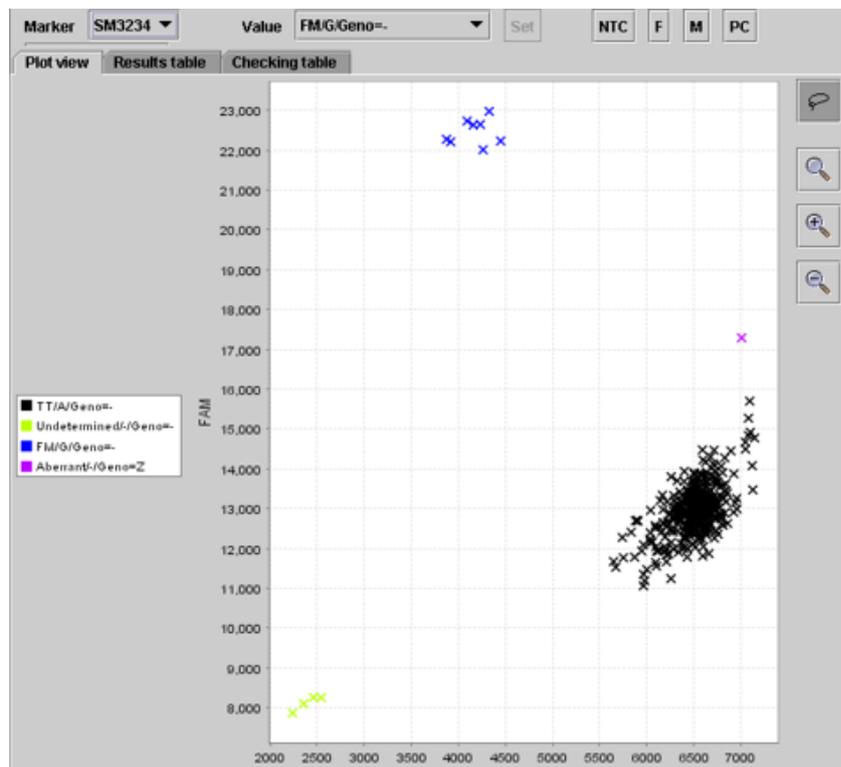
Fonte: Do autor (2023).

Figura 13: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador M847.



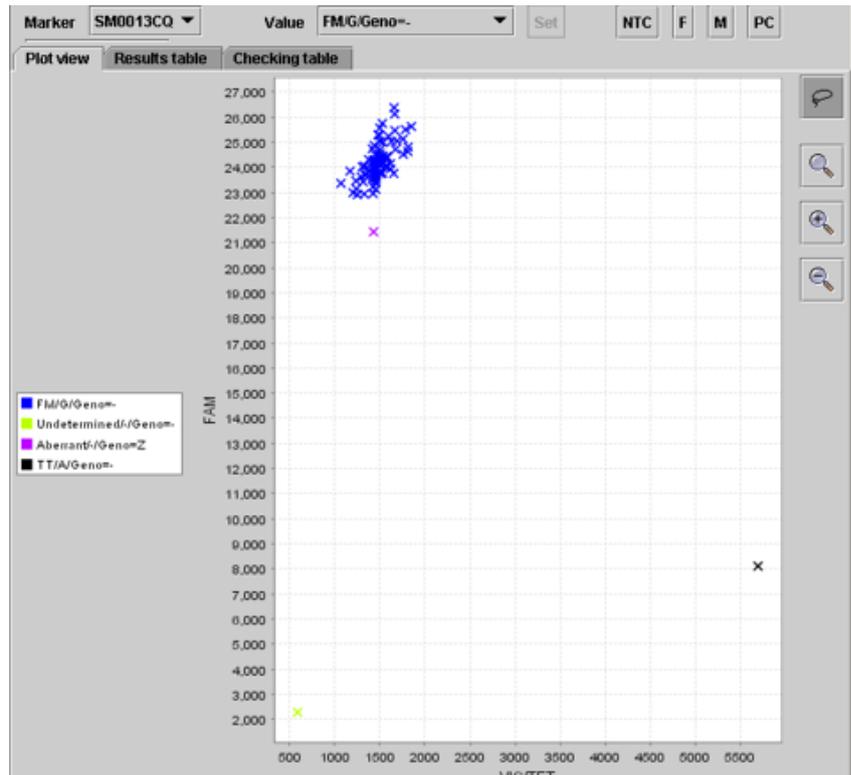
Fonte: Próprio autor (2023).

Figura 14: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador EXPM06.



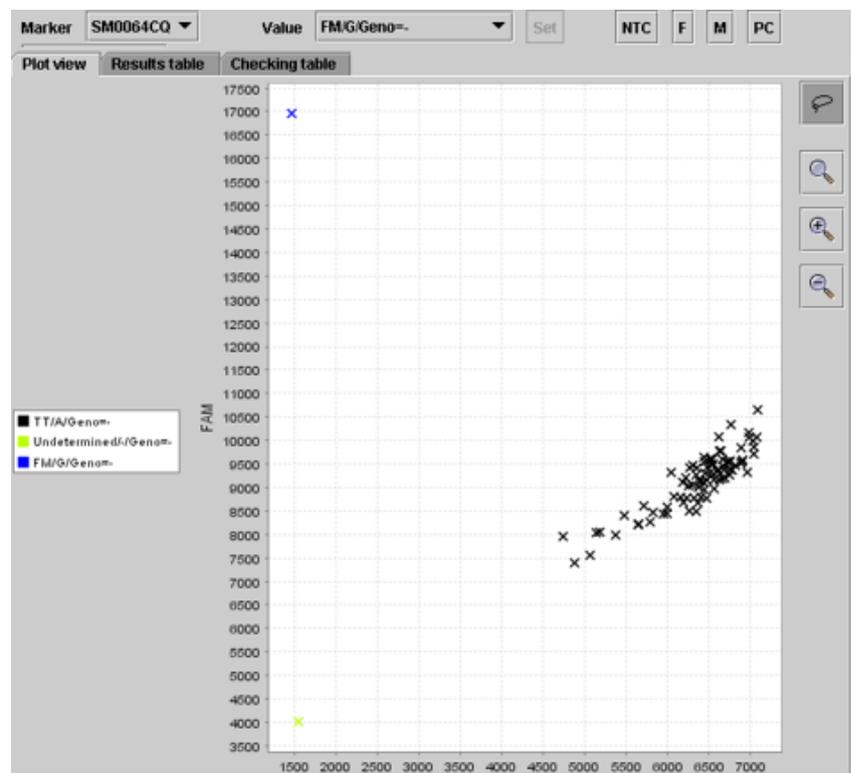
Fonte: Do autor (2023).

Figura 15: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador M850.



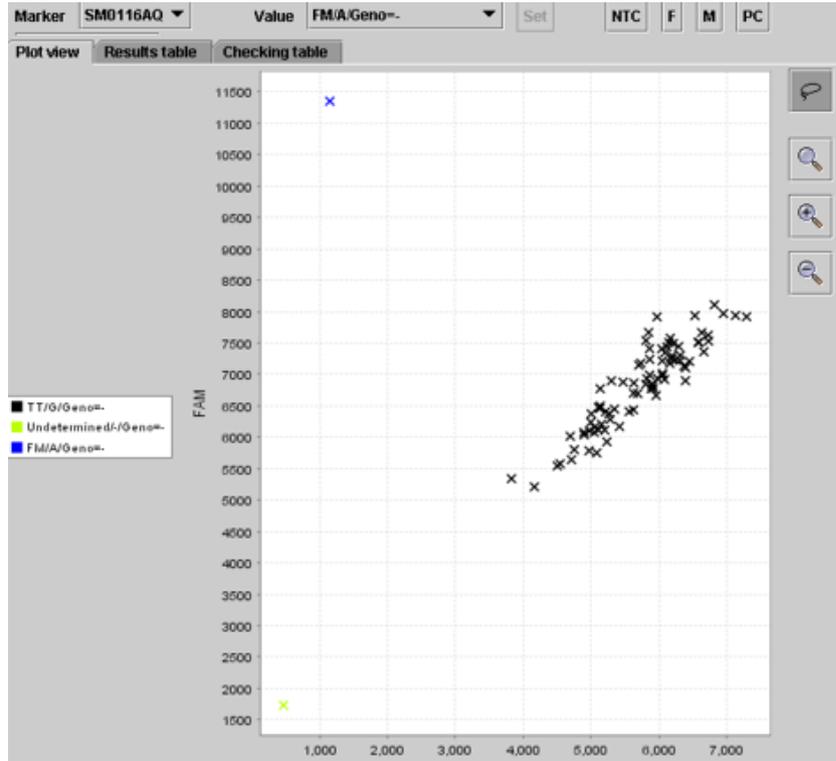
Fonte: Próprio autor (2023).

Figura 16: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador EXPM07



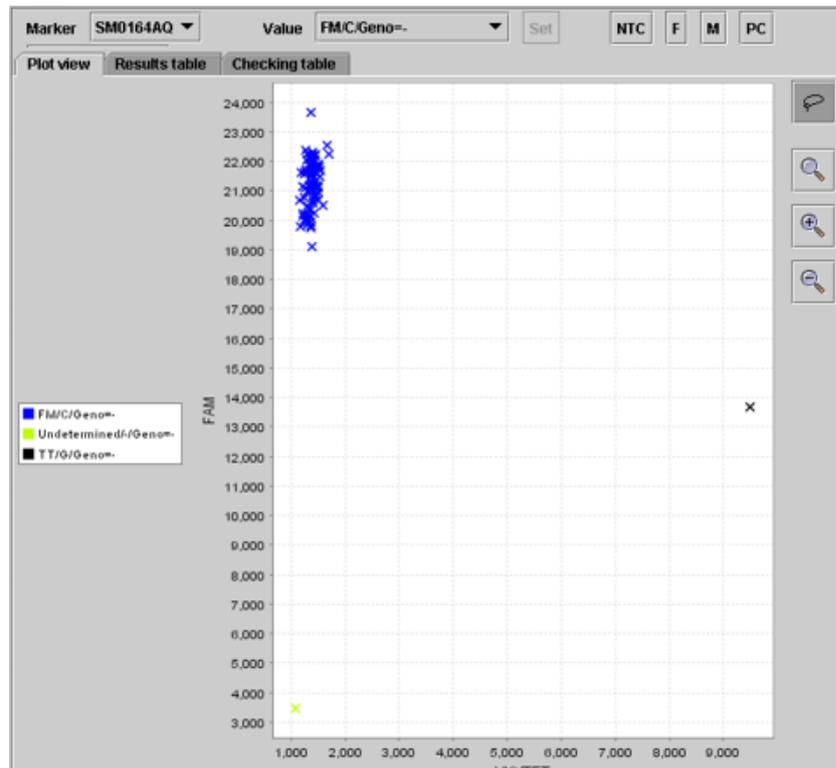
Fonte: Do autor (2023).

Figura 17: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador M853.



Fonte: Do autor (2023).

Figura 18: Clusters indicando a distribuição das amostras do marcador EXPM08.



Fonte: Do autor (2023).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

Os marcadores experimentais possuem o comportamento esperado, similar aos marcadores importados utilizados em protocolo vigente.

Os marcadores experimentais (EXPM01, EXPM02, EXPM03, EXPM04, EXPM05, EXPM06, EXPM07, EXPM08) se mostraram eficientes e com dados obtidos e seguros comparando com os marcadores já empregados (M817, M820, M827, M831, M842, M847, M850, M853), o que possibilita a atualização do protocolo referente a quantidade de coleta dos tecidos vegetais, podendo variar a quantidade do tecido vegetal e o tempo de coleta de acordo com a necessidade do melhorista.

Com os dados obtidos constata-se que é possível realizar a substituição dos oito marcadores consolidados internacionais pelos outros oito marcadores experimentais nacionais, assim, gerando uma economia considerável em relação as taxas de importação.

REFERÊNCIAS

AGBAGWA, I.O. Protocol for high-quality genomic DNA extraction from legumes. **Genetics and Molecular Research**, v.4, p. 4632-4639, 2012.

ALZATE-MARIN, A. L. Seleção assistida por marcadores moleculares visando ao desenvolvimento de plantas resistentes a doenças, com ênfase em feijoeiro e soja. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v.30, n.4, p. 333-342, 2005.

ANDORF, C.; BEAVIS, W.D.; HUFFOD, M.; SMITH, S.; SUZA, W.P.; WANG, K.; WOODHOUSE, M.; YU, J.; LÜBBERSTEDT, T. Technological advances in maize breeding: past present and future. **Theoretical and Applied Genetics**. Springer, v.132, n.3, p. 817-849, 2019.

AVISE, J.C. Molecular markers natural history and evolution. New York: Chapman & Hall, p. 817-849, 1993.

BELTRAME, F.; RAMOS, A. W.; FONSECA, F.C.S. Aplicações práticas dos algoritmos de Clusterização Kmeans e Bisecting k-means. Departamento de informática, Universidade Federal do Espírito Santo, Ed. UFES, v.3, p. 129, 2010.

BOOPATHI, N.M. **Genotyping of mapping population. Genetic Mapping and Marker Assisted Selection**. Nova Delhi, Springer, p.39-80, 2013.

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa, Ed. UFV, v.20, p.547, 1997.

BORÉM, A.; MIRANDA, G.V. **Melhoramento de plantas**. Viçosa, Ed. UFV, v.6, rev. e ampl., p.523, 2013.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLMICK, H. **Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism**. American Journal of Human Genetics, v.32, p.314-331, 1980.

BOUCHET, S.; SERVIN, B.; BERTIN, P.; MADUR, D.; COMBES, V.; DUMAS, F.; BRUNEL, D.; LABORDE, J.; CHARCOSSET, A.; NICOLAS, S. **Adaptation of maize to temperate climates: mid-density genome-wide association genetics and diversity patterns reveal key genomic regions, with a major contribution of the Vgt2 (ZCN8) locus**. Plos One, v.8, p.71-377, 2013.

BROOKES, A.J. **The essence of SNPs**. Gene, v.234, n.2, p.177-186, 1999.

BUENO, L. C. S.; MENDES, A. N. G.; CARVALHO, S. P. **Melhoramento de plantas: princípios e procedimentos**. Lavras: Ed. UFLA, p. 282, 2001.

BUTLER, J. M. - Sample Collection, DNA Extraction and Quantification. Em **Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers**. Elsevier, p. 33-62, 2005.

CARVALHO, M. R. - Single nucleotide polymorphisms (SNPs) com aplicação forense. *Genética forense: Perspectivas da identificação genética*. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa, p. 187–198, 2010.

CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. **Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining**. *Plant Molecular Biology Reporter*, v.19. P.299-306, 2001.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Série histórica de safras: maio 2021**. Brasília: CONAB, 2022. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras?start=20>>. Acesso em: 27 jan. 2023.

CONSORTIUM. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science*, v. 324, p. 522 -528, 2009.

DELLAPORTA, S.L; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant mini preparation: version II. *Plant Molecular Biology Report*. v.1, p. 19-20, 1983.

DUARTE, J.O.; GARCIA, J.C.; MIRANDA, R.A. Cultivo do milho: Mercado e Comercialização. **Embrapa Milho e Sorgo: Sistema de Produção**. Versão Eletrônica, v.7, set., 2011.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Importância Socioeconômica**, 2004. Disponível em: <http://rbms.cnpms.embrapa.br/index.php/ojs/article/view/105/pdf_393>. Acesso em: 04 abr. 2023.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Sistema de Produção, Cultivo do Milho**, 2010. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/index.htm>. Acesso em: 12 jun. 2022.

FALEIRO, F.G.; PIRES, J.L.; MONTEIRO, W.R.; LOPES, U.V.; YAMADA, M.M.; PIEDRA, A.G.; MOURA, A.D.; ARÉVALO-GARDINI, E.; MARQUES, J.R B.; GRAMACHO, K P.; FALEIRO, A.S.G.; SANTOS, M.C.M. **Variability in cacao accessions from the Brazilian, Ecuadorian, and Peruvian Amazons based on molecular markers**. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, Viçosa, v. 4, p. 227-233, 2007.

FEHR, W.R. **Principles of cultivar development: theory and technique**. New York: Macmillan Publishing Company, v.1, p.761, 1987.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, v.3, p.220, 1998.

FRANCIA, E.; RIZZA, F.; CATTIVELLI, L.; STANCA, A.M.; GALIBA, G.; TOTH, B.; HAYES, P.M. **Two loci on chromosome 5H determine low-temperature tolerance in a “Nure” (winter), “Tremois” (spring) barley map**. *Theor. Appl. Genet*, v.108, p.670-680. 2004.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Principles of population genetics**. Sunderland: Sinauer Associates, v. 2, p.682, 1989.

JACCOUD, D.; PENG, K.; FEINSTEIN, D.; KILIAN, A. Diversity Arrays: a solid-state technology for sequence information independent genotyping. **Nucleic Acids Research**, v.29, n7, p.1-7, 2001

KOTA, R. **Application of denaturing high-performance liquid chromatography for mapping single nucleotide polymorphisms in barley (*Hordeum vulgare* L.)**. Genome, v.44, n.4, p.523–528, 2001.

LI, R.; LI, Y.; FANG, X.; SNP detection for massively parallel whole-genome resequencing. Genome Research, 2009.

LIU, S.; SAHA, S.; STELLY, D.; BURR, B.; CANTRELL, R. G. **Chromosomal assignment of microsatellite locos in cotton**. Journal of Heredity, v. 91, n. 4, p. 326-32, 2000.

MASUKA, B.; ATLIN, G.N.; OLSEN, M.; MAGOROKOSHO, C.; LABUSCHAGNE, M.; CROSSA, J.; BANZIGER, M.; PIXLEY, K.V.; VIVEK, B.; BILJON, A.; MACROBERT, J.F.; ALVARADO, G., PRASANNA, B.M.; MAKUMBI, D.; MAKUMBI, D.; TAREKEGNE, A.T. DAS, B.; ZAMAN-ALLAH, M.; CAIRNS, J.E. **Gains in maize genetic improvement in Eastern and Southern Africa: I. CIMMYT hybrid breeding pipeline**. Crop Science, v.57, p.168-179, 2017.

MATUKUMALLI, L.K.; LAWLEY, C.T.; SCHNABEL, R.D. **Development and characterization of a high-density SNP genotyping assay for cattle**. Plos one, v.4, p. 5350, 2009.

MEKSEM, K.; RUBEN, E.; HYTEN, D.; TRIWITAYAKORN, K.; LIGHTFOOT, D.A. Conversion of AFLP bands into high-throughput DNA markers. **Molecular and Genetic Genomics**, v. 265, p.207-214, 2001.

MIRANDA, G.V; GALVÃO, J.C.C. **Tecnologia de Produção de Milho**, v.20: p.82-139, 2008.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M.S. **Melhoramento do milho**. In: BORÉM, A. (ed.). Melhoramento de espécies cultivadas. UFV, p. 429-486, 1999.

PEIXOTO, C.M. **O milho no Brasil, sua importância e evolução**, 2014. Disponível em:<<http://www.pioneersementes.com.br/media-center/artigos/165/o-milho-no-brasil-sua-importancia-e-evolucao>>. Acesso em: 03 jan. 2023.

PINHEIRO, M. F. **Algumas perspectivas da identificação genética. Genética forense: perspectivas da identificação genética**. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa, p. 17–78, 2010.

QUIRINO, M. S. **Polimorfismos de seqüência nucleotídica em fragmentos genômicos de cana-de-açúcar homólogos a genes de resistência**. 2003. 52 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

RAMALHO, M.P.; LAMBERT, E.S. Biometria e o melhoramento de plantas na era genômica. **Revista Brasileira de Sorgo e Milho**. Lavras, Editora UFLA, v.3, n.2, p.228-249, 2004.

RAMOS, N.P. Sensibilidade dos microssatélites para determinar a pureza varietal em sementes de milho. *Revista Brasileira de Sementes*, v.28, n.1, p. 99-105, 2006.

RASMUSSEN, M.; ANZICK, S.L.; WALTERS, M.R. **The genome of a late Pleistocene human from a Clovis burial site in western Montana**. *Nature*, v.506, p.225-229, 2014.

RIBAUT, J.M.; VICENTE, M.C.DE; DELANNAY, X. Molecular breeding in developing countries: Challenges and perspectives. **Current opinion in plant biology**. Oxford, v. 13, p. 213-218, 2010.

SANTOS DOS, D.C. **Adaptabilidade e estabilidade de híbridos de milho em ensaios avançados**. 2016. 44 p. Dissertação (Mestrado Profissional em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

SILVA, W.; PATERNIANI, E.; SOLOGUREN, L.; Di CIERO, L. **Milho a tecnologia do campo à mesa. Conselho de Informações sobre Biotecnologia (CIB)**, 2006.

Disponível em: <http://www.cib.org.br/pdf/guia_do_milho_CIB.pdf>. Acesso em: 13 fev. 2023

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA. **Foreign Agricultural Service**. Washington DC, IPAD/PECAD, 2022. Disponível em:

<<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2023.

USECHE, F.J.; GAO, G.; HARAFEY, M.; RAFALSKI, A. High-throughput identification, database storage and analysis of SNPs in EST sequences. **Genome Informatics**, v.12, p.194-203, 2001.

VENCOVSKY, R.; RAMALHO, M.A.P. Contribuição do melhoramento genético de plantas no Brasil. In: PATERNIANI, E. (ed.). **Agricultura brasileira e pesquisa agropecuária**. Embrapa comunicação para transferência de tecnologia, p.57-89, 2000.

VON PINHO, E.V R.; VON PINHO, R.G.; CÍCERO, S.M. Efeito da contaminação genética em campos de produção de sementes sobre o comportamento de diferentes híbridos de milho (*Zea mays* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.18, n.2, p. 256-261, 1996.

ANEXO – PRODUTO TÉCNICO ATRELADO

SUSTENTABILIDADE- USO CONCIENTE DOS DEFENSIVOS AGRICOLAS

INTRODUÇÃO

São considerados defensivos agrícolas os produtos que são pertencentes e caracterizados dentro dos grupos de herbicidas, pesticidas e fungicidas. São também nomeados como: praguicida, remédios ou veneno em uma nomenclatura mais popular. São substâncias químicas condicionadas em um contexto prático que compete a proteção contra as doenças e pragas que por sua vez acomete as culturas (PERES, 2009).

A cadeia produtiva mundial fica dependente ao uso dos defensivos agrícolas com a finalidade de proteção de plantas com intuito de garantir a alta produtividade. A lei que regulamenta o uso dos agrotóxicos no Brasil iniciou em 1989 e o decreto de 2002, instituiu essas substâncias como:

Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cujo objetivo seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim da preservação da ação trágica dos seres vivos considerados nocivos (CARNEIRO et al., p.98, 2012).

Segundo Travella (2011), o Brasil ocupa um lugar de destaque no consumo mundial de agrotóxicos, sendo um dos maiores em âmbito global. Tal fato se dá, pelo aumento expressivo na expansão agrícola e áreas agricultáveis.

No Brasil, a regulamentação afirma que todo defensivo agrícola tem como obrigação a apresentação no rótulo de sua toxicidade em uma faixa com cores já estabelecida quanto ao nível de sua classe toxicológica atrelado ao seu potencial de periculosidade ambiental. Sendo elas classificadas da seguinte forma:

Figura 19: Classificação de toxicidade dos agrotóxicos referente à cor.

CLASSE	TOXICIDADE	COR DA FAIXA DE RÓTULO E BULA	PANTONE MATCHING SYSTEM - PMS
I	Extremamente tóxico	Faixa vermelha	Vermelho PMS Red 199 C
II	Produto altamente tóxico	Faixa amarela	Amarelo PMS Yellow C
III	Produto moderadamente tóxico	Faixa azul	Azul PMS Blue 293 C
IV	Produto pouco tóxico	Faixa verde	Verde PMS Green 347 C

Fonte: Anvisa, p.10, 2018.

A produção de modo sustentável teve seu marco no início do século XX, todavia, vem ganhando mais voz com o passar dos dias, tendo como primícia básica a conservação do meio ambiente e de toda sua fauna presente. Produzir de modo sustentável é o passo principal para a compreensão dos princípios básicos que determina a conservação de manutenção dos recursos ambientais, como também o uso do solo de uma maneira mais assertiva e justa para manter a sua fertilidade (SANTOS, 2012).

Com intuito de levar maior conscientização sobre uso adequado dos defensivos agrícolas, as empresas têm adotado uma técnica que visa garantir essa gestão, a inovadora agricultura de precisão. Essa tecnologia visa o aperfeiçoamento de todos os processos e conseqüentemente a redução de aplicação, evitando desperdícios, diminuindo custos e auxiliando ainda mais na produtividade. A agricultura de precisão auxilia na exatidão dos dados, informação de localização de áreas que necessitam de uma atenção maior, informações geradas através de satélites, drones ou veículos aéreos não tripulado (ARTIOLI; BELONI, 2016).

Quando se trata de sustentabilidade, é necessário o entendimento da necessidade de reformas estruturais e socioeconômicas, a fim de que a informação alcance a todos. Todavia, programas que propiciam o desenvolvimento das práticas agrícolas sustentáveis vêm se tornando fundamentais. Em função disso, a produção agrícola vem deixando de lado as questões técnicas para dar espaço as proporções sociais, culturais, políticas e econômicas. É importante externar que a dinâmica que engloba as questões de produção agrícola, possui uma dinâmica que se remete e é vista em cada região, de modo que, cada assunto possui suas ideias por sua vez, plausível, destinada a cada local em específico (AZEVEDO, 2017).

DESENVOLVIMENTO

Com intuito socioeducativo e demonstrativo no que se refere ao uso inteligente dos defensivos agrícolas e um direcionamento assertivo na pulverização, é oferecido juntamente com a aquisição dos produtos um pacote tecnológico aliado com o MIPD (Manejo Integrado de Pragas e Doenças). Entretanto, são procedimentos aplicados para as primeiras aquisições das cultivares que possui as tecnologias inovadoras recente implantadas a campo comercial.

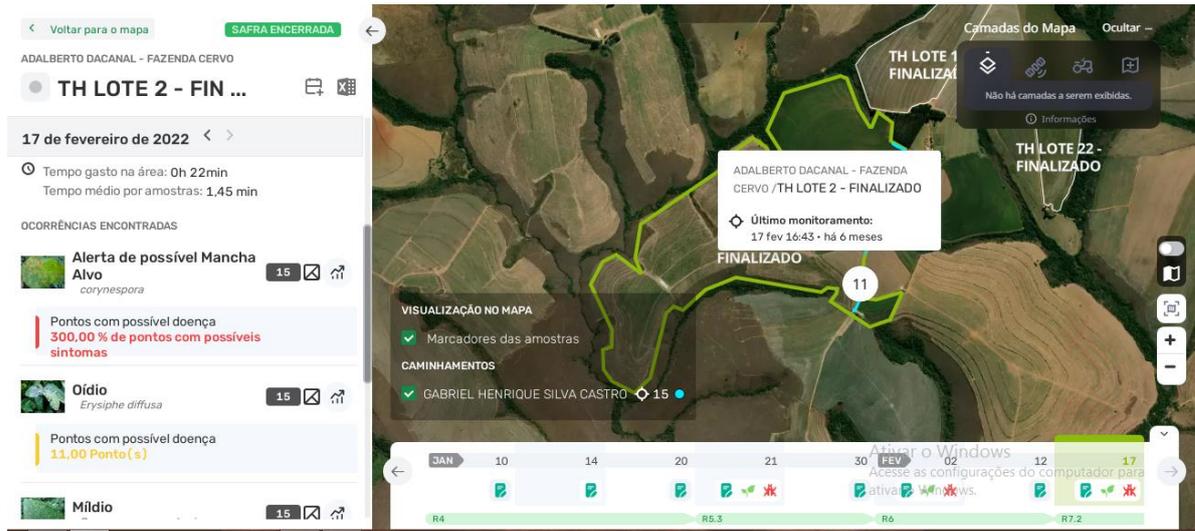
Esse pacote além dos monitoramentos, conta também com um acompanhamento de profissional capacitado que estará presente nos processos de preparo de calda, aplicação e o descarte das embalagens, garantindo assim a conscientização do uso sustentável direcionado.

Os monitoramentos têm o objetivo de analisar a sanidade da lavoura a fim de conhecer e identificar a pressão de pragas que esteja acometendo a cultura, garantindo o controle em tempo hábil. Com isso, o técnico faz todo monitoramento seguindo o protocolo da Embrapa para MIP. Todas as informações encontradas a campo são inseridas em uma plataforma específica, onde já está cadastrado o índice de severidade acordado que atenda a realidade da região e do produtor, sendo diferentes para os campos de produção comercial e os campos de semente.

Quanto aos índices de severidade, tem-se por base os protocolos da Embrapa, assimilando e compilando os dados quantitativos de pragas, doenças e plantas infestantes encontradas em cada ponto amostral, em função disso, é adotado um número específico que seja responsável para fornecer informação para cada índice, controle, equilíbrio e dano, sendo adaptado para cada área mediante a realidade de cada produtor.

Com as informações já inseridas, são gerados os resultados em porcentagem de forma proporcional referente aos pontos amostrais, para cada situação encontrada a campo, plantas infestantes, pragas e doenças, posteriormente, é gerado um mapa de calor mostrando de forma visual a saúde que a área se encontra, tal processo é dividido em três níveis, controle, equilíbrio e dano. Os levantamentos de dados ocorrem uma vez por semana durante todo ciclo da cultura.

Figura 20: Tabulação das informações encontradas a campo.



Fonte: Do autor (2023).

Figura 21: Mapa de calor para visualização os pontos de controle (verde) e equilíbrio (amarelo).



Fonte: Do autor (2023).

Figura 22: Mapa de calor mostrando os pontos de equilíbrio (verde), controle (amarelo) e danos econômicos (vermelho).



Fonte: Do autor (2023).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o trabalho realizado de acompanhamento e orientação quanto ao uso inteligente dos defensivos agrícolas é possível obter um equilíbrio satisfatório entre sustentabilidade.

Sustentabilidade é conquistada através da aplicação direcionada, ou seja, apenas nos pontos específicos onde se encontra uma maior pressão de pragas, não tendo a necessidade de uma pulverização em toda extensão da área e talvez nem mesmo um mix de produtos, visto que, o conhecimento da saúde da área já esteja disponível, se torna mais confortável e assertiva as tomadas de decisões e a rentabilidade se dá, simplesmente, pelo fato da economia no uso de produtos, gerando assim uma diminuição nos custos de produção.

REFERÊNCIAS

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para elaboração de rótulos e bula de agrotóxicos afins e preservativos de madeira.** Anvisa, 2018. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/4016300/GUIA++Elabora%C3%A7%C3%A3o+de+R%C3%B3tulo+e+Bula+-+vers%C3%A3o+28-9-2017+DIARE.pdf/85a0fb5f-a18b-478c-b6ea-e6ae58d9202a?version=1.0>>. Acesso em: 05 mar. 2023.
- ARTIOLI, F.; BELONI, T. Profile diagnosis of users of drones in Brazilian Agribusiness. **Revista IPECEGE**, v.2, n.3, p.40-56, 2016.
- AZEVEDO, R. A. B. Sucessão ecológica, entropia e o modelo autonomia heteronômica para análise dos sistemas agrícolas. **Redes**, v.22, n.2, p.70-91, 2017.
- CARNEIRO, F.F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R.M.; AUGUSTO, L.G.S.; RIZOLLO, A.; FARIA, N.M.X.; ALEXANDRE, V.P.; FRIEDRICH, K.; MELLO M.S.C. Dossiê da ABRASCO. **Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.** Abrasco, Editora Gaia, p.98, 2012.
- PERES, F. Saúde, trabalho e ambiente no meio rural brasileiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.14, n.6, p.1995-2004, 2009.
- SANTOS, J.O. **Organic farming and the sustainability.** Revista Verde, Mossoró, v.7, n.5, p.59-65, 2012.
- TAVALLA, L.B.; SILVA, I.N.; FONTES, L.O.; DIAS, J.R.M.; SILVA, M.I.L. O uso de agrotóxicos na agricultura e suas consequências toxicológicas e ambientais. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v.07, n.2, p.06-12, 2011.