



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências - Câmpus de Botucatu



Rodrigo Brisola Rocha

**Relatório de Estágio de Instrumentação em Biotecnologia:
Melhoramento Vegetal**

Botucatu

2024

Rodrigo Brisola Rocha

**Relatório de Estágio de Instrumentação em Biotecnologia: Melhoramento
Vegetal**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Maria Paula Barion Alves Nunes

Coorientador: Prof^º Dr. Evandro Vagner Tambarussi

Supervisor: Prof^º Dr. Celso Luís Marino

Botucatu

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Rocha, Rodrigo Brisola.

Relatório de estágio de instrumentação em biotecnologia:
melhoramento vegetal / Rodrigo Brisola Rocha. - Botucatu,
2024

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: Maria Paula Barion Alves Nunes

Coorientador: Evandro Vagner Tambarussi

Capes: 50103059

1. Melhoramento vegetal. 2. Biotecnologia. 3. Marcadores
genéticos. 4. Programas de estágio.

Palavras-chave: Biotecnologia; Estágio de instrumentação;
Marcadores moleculares; Melhoramento vegetal.

RODRIGO BRISOLA ROCHA

Relatório de Estágio de Instrumentação em Biotecnologia:
Melhoramento Vegetal

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado a Universidade Estadual
Paulista, como parte das exigências para
a obtenção do título de Bacharel, do curso
de Graduação em Ciências Biológicas.

Botucatu, 04 de dezembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a. Maria Paula Barion Alves Nunes
Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA) da Universidade Estadual Paulista Júlio
de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, SP, Brasil

Prof. Dr. Celso Luís Marino
Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, Instituto de Biociências,
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Botucatu, SP,
Brasil

Prof. Dr. Marcelo Augusto Mendes Alcantara
Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, Instituto de Biociências,
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Botucatu, SP,
Brasil

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por Sua divina providência e cuidado. Agradeço aos meus pais, Benedito e Marisa, pelo apoio durante todo o curso, pelos conselhos e auxílio em tudo o que puderam. Agradeço à Comunidade Católica Levante por ser um abrigo nos períodos difíceis e por todos os amigos que fiz.

Sou grato ao Laboratório de Melhoramento de Plantas Agrícolas e Florestais (LAMPAPF) pelo time maravilhoso, por todo o apoio e pelas oportunidades. Agradeço, de maneira especial, à minha orientadora, Dra. Maria Paula Barion Alves Nunes, que me acolheu no início do laboratório, proporcionando suporte e incentivo constantes. Também agradeço ao professor Dr. Evandro Vagner Tambarussi pelo mesmo acolhimento no início do LAMPAPF e pela coorientação e confiança ao longo do período do estágio. Ao professor Dr. Celso Luís Marino pela supervisão do estágio. Ao professor Dr. Marcelo Augusto Mendes Alcantara pelo aceita em participar da comissão de avaliação do TCC.

Agradeço à Coordenadoria de Permanência Estudantil (COPE) pela bolsa de permanência, que foi fundamental para minha permanência no curso.

A Faculdade de Ciências Agrômicas (FCA) e o Instituto de Biotecnologia (IBTEC) pelo espaço cedido durante o estágio.

RESUMO

Durante o estágio de instrumentação no Laboratório de Melhoramento de Plantas (LAMPAP), pude acompanhar e desenvolver alguns projetos com culturas agrônômicas, como amendoim, mamona, feijão, uva e culturas florestais, como os *Eucalyptus* spp. O melhoramento vegetal busca a obtenção de variedades de plantas com resistência a estresses abióticos e bióticos, além de características que proporcionem maior produtividade e superioridade agrônômica. O avanço da biotecnologia permitiu o surgimento de diversas técnicas utilizadas no estudo da diversidade genética aplicada ao melhoramento vegetal, como o uso de marcadores moleculares que possibilitam a genotipagem e a predição de genótipos superiores, e ferramentas de edição gênica, que auxiliam no avanço dos programas de melhoramento de forma mais precisa. Entre os trabalhos realizados, conseguimos caracterizar variedades de feijão, analisar a diversidade genética, observar a influência de inoculantes em plantas de eucalipto, além de utilizar técnicas de caracterização molecular, como eletroforese e extração de DNA, entre outras. O estágio foi essencial para unir o conhecimento teórico às atividades práticas, desde o campo até o laboratório.

Palavras-chave: Melhoramento vegetal; biotecnologia; marcadores moleculares; estágio de instrumentação.

ABSTRACT

During the instrumentation internship at the Plant Breeding Laboratory (LAMPAF), I had the opportunity to follow and develop projects with agronomic crops such as peanut, castor bean, common bean, grape, as well as forestry crops like *Eucalyptus spp.* Plant breeding aims to develop plant varieties with enhanced resistance to abiotic and biotic stresses, as well as to select traits that promote higher productivity and superior agronomic performance. Advances in biotechnology have enabled the development of various techniques applied to the study of genetic diversity in plant breeding, such as the use of molecular markers, which allow genotyping and the prediction of superior genotypes, and gene-editing tools that enhance breeding programs with greater precision. Among the work carried out, highlights include the characterization of common bean varieties, analysis of genetic diversity, observation of the influence of inoculants on *Eucalyptus spp.* plants, and the use of molecular characterization techniques such as electrophoresis and DNA extraction, among others. This internship was essential for integrating theoretical knowledge with laboratory and field practices, significantly contributing to my professional development.

Keywords: Plant breeding; biotechnology; molecular markers; genetic diversity; instrumentation internship.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Imagens do áreas de plantio sendo delineada em A e um dos tratamentos com as parcelas em B.....	16
Figura 2 - Imagem da placa de petri com as sementes contadas em A, análise das cinco melhores vagens em B e imagem da planta para anotação do hábito de crescimento de uma planta individual.	16
Figura 3 - Emasculação de inflorescencia de mamona.....	18
Figura 4 - Inflorescências cobertas com sacos de papel em A, B cachos cobertos com redes e C sementes maduras colhidas.....	18
Figura 5 - Distribuição das plantas.....	21
Figura 6 - Imagens do experimento. A: Semeadura das progênies, B: plântulas já germinadas no telado, C: mudas já no pleno sol.....	24
Figura 7 - Imagens do teste de progênie. A: sulcos de plantio, B: muda com hidrogel, C: imagem aérea tirada depois de aproximadamente 8 meses de plantio, no reatângulo com borda azul o experimento de Eucalyptus robusta e no vermelho Eucalyptus urophylla.....	25
Gráfico 1 – Média de Altura por Tratamento	22
Gráfico 2 - Média de diâmetro por tratamento.....	22
Gráfico 3 - Dendograma de distância genética de oito porta-enxertos de uva.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tratamentos.....	21
Tabela 2 - Número de alelos (K), heterozigosidade observada (HO), heterozigosidade esperada (HE), índice de conteúdo polimórfico (PIC), Hardy-Weinberg (HW) para cada primer (locus).....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância (<i>Analysis of Variance</i>)
BPCP	Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas
DC	Diâmetro do colo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados (<i>Deoxynucleotide Triphosphates</i>)
HE	Heterozigosidade Esperada
HO	Heterozigosidade Observada
LAMPAF	Laboratório de Melhoramento de Plantas Agrícolas e Florestais
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PIC	Conteúdo Informativo do Polimorfismo (<i>Polymorphic Information Content</i>)
SSR	Microssatélites (<i>Simple Sequence Repeats</i>)
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

m	Metro
ml	Mililitro
rcf	força centrífuga relativa (<i>Relative Centrifugal Force</i>)
pH	Potencial Hidrogeniônico
ng/μL	Nanogramas por microlitro
°C	Grau Celsius

SUMÁRIO

1 SUMÁRIO

1.1.1	INTRODUÇÃO	13
1.1.2	OBJETIVOS	14
1.1.3	ESTRUTURA POPULACIONAL E DIVERSIDADE GENÉTICA DE VARIEDADES CRIOULAS DE FEIJÃO COMUM	15
1.1.4	ESTUDO DA HERANÇA GENÉTICA DA DEISCÊNCIA DO FRUTO NA CULTURA DA MAMONEIRA	17
1.1.5	VARIABILIDADE GENÉTICA E SELEÇÃO DE LINHAS PURAS DE AMENDOIM VISANDO A RESISTÊNCIA ÀS CERCOSPORIOSES.	19
1.1.6	INFLUÊNCIA DE DIFERENTES INOCULANTES NO ESTABELECIMENTO E CRESCIMENTO DE UM CLONE DE <i>EUCALYPTUS GRANDIS</i> X <i>EUCALYPTUS UROPHYLLA</i> .	20
1.1.7	VARIABILIDADE GENÉTICA DE CARACTERES QUANTITATIVOS EM <i>EUCALYPTUS UROPHYLLA</i> E <i>EUCALYPTUS ROBUSTA</i>	23
1.1.8	DIVERSIDADE GENÉTICA MICROSSATÉLITES EM PORTA-ENXERTOS DE VIDEIRA	25
1.1.9	TÉCNICAS DE BIOTECNOLOGIA	27
1.1.10	EXTRAÇÃO DE DNA VEGETAL	28
1.1.11	ELETROFORESE	29
1.1.12	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	29
1.1.13	CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
1.1.14	REFERÊNCIAS	31

1.1.1 INTRODUÇÃO

Atualmente a biotecnologia está presente em grandes partes dos processos e áreas da ciência, promovendo diferentes benefícios combinando princípios biológicos, químicos, e de engenharia para desenvolvimento de novas tecnologias que também fortalecem a agricultura e conservação de recursos naturais e variabilidade existente.

Uma das subáreas da biotecnologia é o melhoramento vegetal que procura a obtenção de variedades de plantas com resistência a estresses abióticos e bióticos, obtenção de caracteres com maior produtividade, características agrônômicas superiores (BORÉM; MIRANDA; FRITSCHÉ-NETO, 2021).

Com o avanço da biotecnologia, surgiram diversas técnicas utilizadas no estudo da diversidade genética no melhoramento vegetal como o uso de marcadores moleculares permitindo a genotipagem e predição de genótipos superiores, ferramentas de edição gênica, que auxiliam no avanço dos programas de melhoramento de forma mais precisa. Além disso, essas inovações são cruciais na conservação da variabilidade genética das espécies cultivadas, com o aumento das necessidades agrícolas, a busca por variedades, clones com características superiores e alta uniformidade, promove perda da diversidade nas populações e ocorre um estreitamento da base genética tornando essas variedades vulneráveis a fatores externos em situações atípicas (JARVIS *et al.*, 2000). As previsões indicam um aumento em 2° C até 2030 (IPCC, 2021), nesse sentido a diversidade genética permite a seleção de plantas mais resilientes as mudanças climáticas, que podem prosperar em condições de déficit hídrico, salinidade, altas temperaturas e outros desafios (CECCARELLI; GRANDO, 2019).

A busca por monoculturas homogêneas e uma seleção intensiva por caracteres específicos coloca em risco as variedades tradicionais, ou seja, aquelas que são a origem da diversidade genética presente nos clones ou plantas comerciais, isso pode ser observado no fenômeno compreendido como erosão genética que abrange principalmente culturas o feijão, pois a recorrência pelas mesmas variedades e grandes monoculturas acarreta na perda ou falta de genes que possibilitam resistência a diversos patógenos (CARBONEL *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2012; SILVEIRA *et al.*, 2019). Nesse contexto a preservação desses recursos é vital para o fortalecimento da agricultura e segurança alimentar das futuras gerações, os

programas de melhoramento devem buscar integrar essa variabilidade das variedades tradicionais ou crioulas, as quais provêm dos centros de origem e domesticação dessas espécies, isso assegura a sustentabilidade agrícola e fornece material genético para atender a demanda por alimentos perante o aquecimento global.

Diante da necessidade apresentada, o melhoramento vegetal é uma ferramenta essencial para mitigar os efeitos das mudanças climáticas além de aproveitar o uso das áreas cultivadas permitindo maior produtividade dessas culturas, evitando assim a busca por novas áreas.

1.1.2 OBJETIVOS

O objetivo do estágio foi acompanhar as atividades desenvolvidas no Laboratório de Melhoramento de Plantas Agrícolas e Florestais (LAMPAP) do Departamento de Produção Vegetal da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) – UNESP/Botucatu, com foco em diversas técnicas de melhoramento utilizadas nos projetos em andamento. Durante o estágio, busquei compreender e dar suporte às diferentes etapas dos projetos, colaborando com os colegas do laboratório nas diversas fases experimentais, como o desenvolvimento de cruzamentos controlados, uso de marcadores moleculares, como técnicas básicas de extração de DNA, reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese. O estágio também proporcionou a oportunidade de estudar a variabilidade genética de várias espécies vegetais e participar ativamente de atividades de campo, contribuindo para o aprimoramento dos conhecimentos práticos e teóricos em melhoramento vegetal.

1.1.3 ESTRUTURA POPULACIONAL E DIVERSIDADE GENÉTICA DE VARIEDADES CRIOULAS DE FEIJÃO COMUM

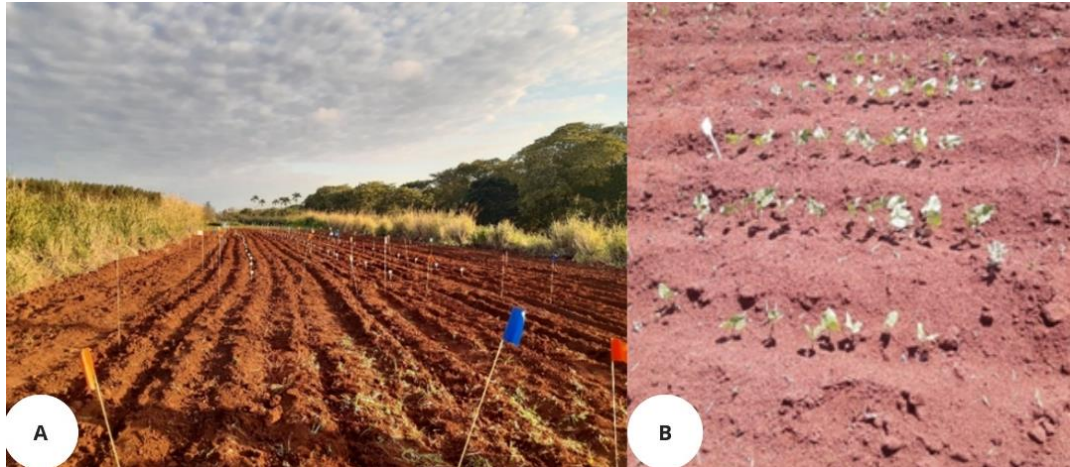
O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das leguminosas mais importantes para o consumo humano direto; é fonte de proteínas, fibras, ferro, carboidratos, vitaminas e minerais, sendo cultivado em mais de cem países (BLAIR *et al.*, 2013; FAO, 2023).

O Brasil tem destaque como o segundo maior produtor e o maior consumidor de feijão comum, contribuindo com cerca de 12% do total da produção mundial (FAO, 2023). O cultivo do feijão comum no país é extremamente diverso devido a diferentes ambientes, múltiplos sistemas de produção e preferências dos agricultores, os quais, em sua maioria são classificados como agricultura familiar que comumente utilizam de variedades crioulas (COELHO *et al.*, 2010; Bertoldo *et al.*, 2014; CONAB, 2023).

As variedades crioulas, ou *landraces*, são o resultado do manejo *on farm* da agrobiodiversidade realizado por pequenos produtores. Através do cultivo contínuo destes materiais são selecionados, ao longo dos anos, os genótipos mais adaptados às condições ambientais locais, resistentes a pragas e doenças específicas da região, e que possuam as características culinárias que atendam às demandas de produção e preferências de consumo únicas daquela área em particular (COELHO *et al.*, 2007; SILVEIRA *et al.*, 2019). Dessa forma, a conservação *on farm* permite a manutenção progressiva dos processos evolutivos, desenvolvendo, por meio de mutações acumuladas, recombinação gênica e quebra de blocos de ligação, uma base genética de ampla variabilidade para a adaptabilidade das populações e para programas de melhoramento, caracterizando estas populações como misturas de linhas puras em espécies autógamas, como o feijão comum (ZANOTTO, 1993; YEKEN *et al.*, 2018).

Os objetivos desse projeto foi caracterizar variedades crioulas de feijão de diferentes regiões do estado de São Paulo, utilizando caracteres morfoagronômicos, além de uma posterior caracterização molecular. O delineamento experimental foi de blocos casualizados com 14 tratamentos (14 variedades crioulas) e quatro repetições, observa-se na figura 1, o preparo do solo e um dos tratamentos com 3 parcelas paralelas e linhas de bordadura.

Figura 1 - Imagens do áreas de plantio sendo delineada em A e um dos tratamentos com as parcelas em B.



Fonte: Arquivopessoal, 2023.

Sedo o feijão uma planta autógama, todas as avaliações realizadas foram de plantas individuais. Para caracterização foram utilizados 21 caracteres qualitativos e 7 quantitativos propostos para *Phaseolus vulgaris* L. pela International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI, 2001), alguns dos carateres podem ser vistos na figura 2, onde foram realizada contagem das 5 melhores vagens, hábito de crescimento da planta além do número de sementes por vagens. As análises estatísticas ao longo do projeto estão sendo realizadas no software R studio.

Figura 2 - Imagem da placa de petri com as sementes contadas em A, análise das cinco melhores vagens em B e imagem da planta para anotação do hábito de crescimento de uma planta individual.



Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

1.1.4 ESTUDO DA HERANÇA GENÉTICA DA DEISCÊNCIA DO FRUTO NA CULTURA DA MAMONEIRA

No Brasil, o cultivo da mamoneira tem se expandido, especialmente na região do Cerrado, devido à sua viabilidade técnica quando cultivada em sucessão à soja na "safrinha tardia" (MELHORANÇA & STAUT, 2005). Esse sistema é favorecido pela alta tolerância da mamoneira à falta de água, o que permite seu cultivo em áreas que seriam inadequadas para o milho (SÁ et al., 2015). Além disso, a rotação com mamoneira contribui para o equilíbrio do sistema agrícola, ajudando a controlar pragas como nematoides de galha, favorecendo a ciclagem de nutrientes, protegendo o solo e melhorando sua estrutura devido ao sistema radicular profundo da planta (SÁ et al., 2015; PIVETTA et al., 2017). O controle genético da deiscência na mamoneira ainda é pouco compreendido, com poucos estudos na literatura e resultados frequentemente controversos. Assim, o objetivo de um dos projetos do LAMPAF é revisar e aprofundar o entendimento sobre a herança dessa característica, de modo a possibilitar a colheita mecanizada e otimizar o beneficiamento da cultura da mamoneira, procurando obter de populações segregantes por meio de cruzamentos controlados em casa de vegetação, preparo da área experimental, semeadura, manejo e demais tratamentos culturais e avaliação e análise de dados.

Entre as técnicas utilizadas neste projeto, destaca-se o cruzamento controlado. Nesse método, o melhorista tem total controle sobre as plantas que serão cruzadas. O processo envolve a remoção das flores masculinas figura 3, antes da abertura das flores femininas para evitar a polinização indesejada e garantir que o pólen de uma planta específica seja transferido para outra. O cruzamento controlado é utilizado para combinar características específicas de duas plantas parentais, como resistência a doenças ou características de produtividade.

Após a emasculação, as inflorescências são cobertas com sacos de papel e presos com cliques figura 4. Os sacos são deixados por aproximadamente dois a três dias. Em seguida, com a ajuda de uma placa de Petri e uma pinça, os grãos de pólen da planta parental masculina são coletados. O saco da inflorescência emasculada é aberto e o pólen é transferido para o estigma das flores femininas. Após a polinização, o cacho é novamente coberto e o cruzamento é identificado com plaquinhas presas ao pedúnculo da inflorescência.

Após alguns dias, caso o cruzamento tenha sido bem-sucedido, espera-se algumas semanas e substitui-se os sacos de papel por sacos maiores. Quando os cachos estão quase maduros, os sacos de papel são retirados e substituídos por redes de malha fina para evitar a perda das sementes figura 4, uma vez que algumas plantas apresentam deiscência, ou seja, o pericarpo da semente se abre espontaneamente quando madura. Depois da maturação os cachos são cortados e as sementes armazenadas para condução das próximas gerações.

Figura 3 - Emasculação de inflorescência de mamona.



Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

Figura 4 - Inflorescências cobertas com sacos de papel em A, B cachos cobertos com redes e C sementes maduras colhidas.



Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

1.1.5 VARIABILIDADE GENÉTICA E SELEÇÃO DE LINHAS PURAS DE AMENDOIM VISANDO A RESISTÊNCIA ÀS CERCOSPORIOSES.

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma leguminosa fundamental tanto na alimentação humana quanto na indústria, destacando-se pela produção de grãos ricos em óleos, proteínas e outros compostos bioativos. No Brasil, a cultura do amendoim ocupa uma posição de destaque, sendo um dos maiores produtores e exportadores mundiais. Seu cultivo se dá principalmente em regiões tropicais e subtropicais, e sua adaptação ao clima brasileiro favorece a produção em larga escala, principalmente nas regiões Norte e Nordeste (GODOY et al., 1999). O melhoramento genético do amendoim visa o desenvolvimento de cultivares com características agronômicas superiores, como maior resistência a doenças, especialmente as cercosporioses, que afetam a planta devido a fungos do gênero *Cercospora*.

A resistência a essas doenças é de extrema importância para manter a produtividade e a qualidade dos grãos, além de reduzir perdas econômicas associadas à infecção. O uso de técnicas de cruzamento controlado e seleção de linhas puras tem sido uma abordagem importante nesse processo, buscando variedades mais produtivas e resistentes. No amendoim, as flores são hermafroditas, o que significa que contêm tanto órgãos sexuais masculinos quanto femininos. Para realizar cruzamentos controlados, é necessário realizar a emasculação, um processo em que as anteras e filetes são removidos da flor antes da antese (abertura da flor). Esse procedimento é feito com o auxílio de pinças de relojoeiro, que permitem a remoção cuidadosa das partes masculinas. Após a emasculação, as flores devem ser identificadas corretamente utilizando etiquetas para evitar confusão.

É importante realizar a emasculação no período da tarde, para garantir que no dia seguinte as flores já estejam abertas e prontas para a coleta do pólen. O pólen é então transferido para o estigma da flor emasculada, utilizando uma técnica delicada para garantir uma boa fecundação. Após a polinização, o próximo passo é aguardar o sucesso do pegamento das flores, ou seja, a fertilização bem-sucedida (NIGAM, RAO e GIBBONS, 1990).

1.1.6 INFLUÊNCIA DE DIFERENTES INOCULANTES NO ESTABELECIMENTO E CRESCIMENTO DE UM CLONE DE *EUCALYPTUS GRANDIS* X *EUCALYPTUS UROPHYLLA*.

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) têm se destacado como uma alternativa sustentável para melhorar o desenvolvimento de culturas agrícolas e florestais, contribuindo para o aumento da produtividade e redução da dependência de fertilizantes químicos (BASHAN et al., 2004; HAYAT et al., 2010). Pela capacidade de promoção biológica do nitrogênio espécies como *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium japonicum* e extratos de algas como *Ascophyllum nodosum* demonstraram efeitos positivos na fase inicial de espécies vegetais, além de auxiliar na solubilização de nutrientes e produção de fitormônios (SHAHZAD et al., 2021; KHAN et al., 2009).

No setor florestal, o uso dessas tecnologias em clones de eucalipto, como o clone I144 (*Eucalyptus urograndis*), é promissor, considerando sua relevância econômica e a necessidade de práticas mais eficientes e sustentáveis no manejo silvicultural (SILVA et al., 2015). Este trabalho do LAMPAF investigou inoculantes comerciais à base de BPCPs no crescimento inicial de mudas do clone I144 de *Eucalyptus*, com o objetivo de avaliar o impacto dessas formulações no diâmetro do colo e na altura das plantas. Para isso, realizamos um experimento no viveiro do Departamento de Ciências Florestais da Faculdade de Ciências Agrônômicas (FCA/UNESP), localizado na Fazenda Lageado, Botucatu.

Os produtos testados foram os inoculantes comerciais Acadian (à base de *Ascophyllum nodosum*), Rizokop (composto por *Bradyrhizobium japonicum*) e Azokop (contendo *Azospirillum brasilense*), aplicados individualmente ou em combinações. Os tratamentos foram organizados conforme a tabela 1.

Tabela 1 - Tratamentos

Tratamento	Descrição
T1	Akadian (<i>Ascophyllum nodosum</i>)
T2	Rizokop (<i>Bradyrhizobium japonicum</i>)
T3	Azokop (<i>Azospirillum brasilense</i>)
T4	Akadian + Rizokop
T5	Akadian + Azokop
T6	Rizokop + Azokop
T7	Akadian + Rizokop + Azokop
T8	controle (sem inoculante)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os inoculantes foram aplicados conforme as recomendações dos fabricantes, utilizando mudas de 90 dias de idade. Após a inoculação, as mudas foram plantadas e acompanhadas por 4 meses. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 10 plantas por tratamento, totalizando 80 plantas conforme a figura 5.

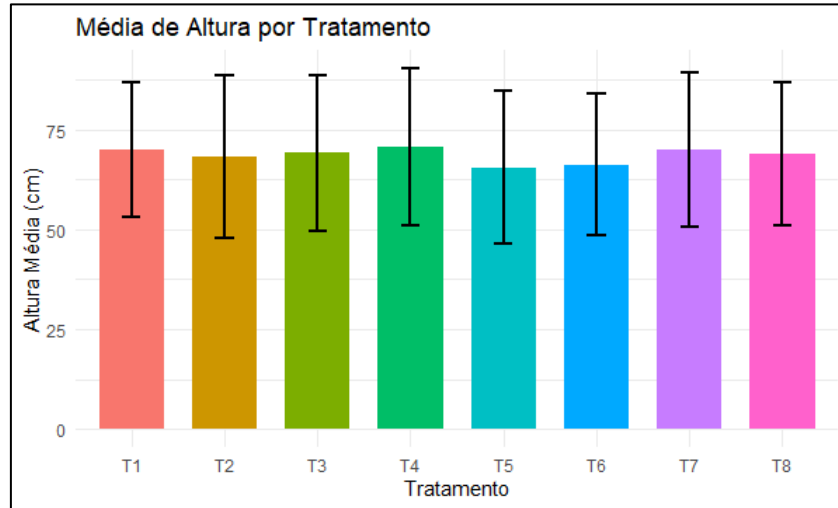
Figura 5 - Distribuição das plantas.



Fonte: Arquivo pessoal, 2024.

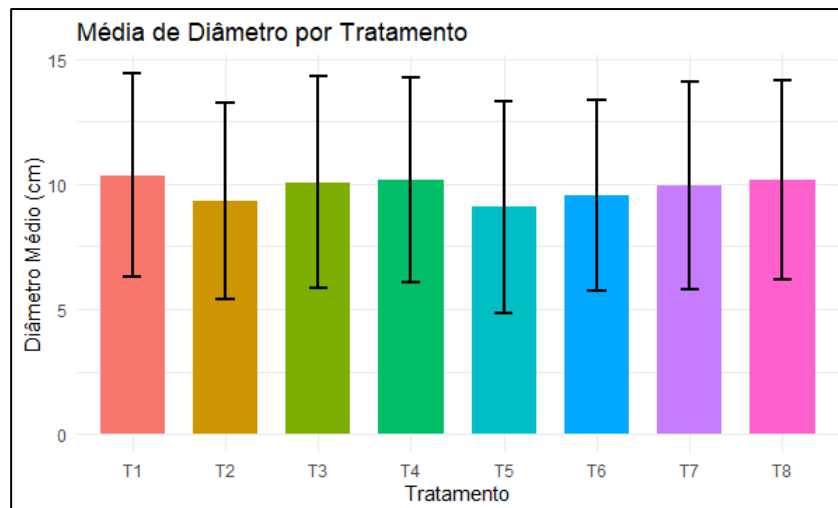
As variáveis analisadas foram o diâmetro do colo (DC) e altura das plantas em cm, registradas ao final do período experimental. Considerando um nível de significância de 5%, os dados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) e ao Teste de Tukey.

Gráfico 1 – Média de Altura por Tratamento



Fonte: Elaborada pelo autor.

Gráfico 2 - Média de diâmetro por tratamento.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados mostraram que os inoculantes influenciaram significativamente ambas as variáveis avaliadas. Para a altura das plantas, os tratamentos T4 (Acadian) e T7 (combinação dos três inoculantes) e T1 (Acadian) apresentaram os melhores desempenhos gráfico 1, com médias significativamente superiores aos demais

tratamentos. Já para o diâmetro do colo, as maiores médias foram registradas nos tratamentos T1 e T4 (Acadian + Rizokop) gráfico 2.

Este projeto do laboratório buscou entender o potencial dos inoculantes para melhorar o crescimento inicial de mudas de *Eucalyptus spp.* Contudo, estudos complementares são necessários para aprofundar o entendimento dos mecanismos de ação desses produtos e avaliar sua viabilidade em escala comercial.

1.1.7 VARIABILIDADE GENÉTICA DE CARACTERES QUANTITATIVOS EM *EUCALYPTUS UROPHYLLA* E *EUCALYPTUS ROBUSTA*

A variabilidade genética de *Eucalyptus urophylla* e *Eucalyptus robusta* destaca a importância dessas espécies para programas de melhoramento florestal e estudos de caracteres quantitativos. *Eucalyptus urophylla* é nativo de ilhas na Indonésia, é amplamente utilizado como parental em cruzamentos híbridos devido à sua adaptabilidade, heterose para crescimento e resistência a doenças. No entanto, a conservação de suas populações naturais enfrenta desafios devido à expansão agrícola e à necessidade de proteção da base genética para assegurar o progresso no melhoramento e a sustentabilidade das plantações frente às mudanças climáticas globais (PEPE et al., 2004).

Já *Eucalyptus robusta*, amplamente cultivada fora da Austrália, é reconhecido por seu crescimento rápido, tolerância a condições adversas, como alagamentos prolongados, e utilidade em diversas aplicações, desde produção de madeira e carvão até recuperação de áreas degradadas (CABI, 2024). A ampla adaptabilidade dessas espécies ressalta sua relevância econômica e ambiental, justificando o investimento em estudos genéticos e na avaliação de progênies em campo, como os realizados na Faculdade de Ciências Agrônômicas. Esses estudos visam estimar parâmetros genéticos que auxiliem na seleção de genótipos superiores para diferentes ambientes e demandas.

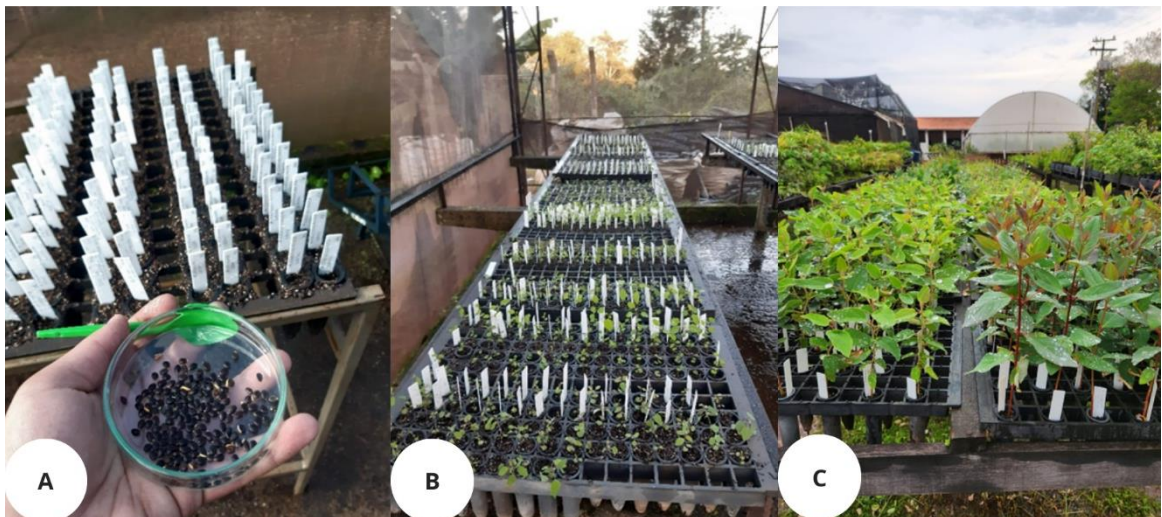
O experimento foi delineado utilizando-se um esquema de blocos casualizados, composto por três blocos, com cinco plantas lineares por progênie e 20 plantas por linha, em espaçamento de 3 m x 2 m. Inicialmente, as sementes foram semeadas em

bandejas contendo tubetes preenchidos com substrato à base de Turfa de sphagnum, vermiculita expandida, calcário dolomítico, gesso agrícola e fertilizante NPK.

Antes do plantio, as plaquinhas de identificação foram previamente preparadas, contendo o nome da progênie e o número da planta. Depois de semeadas, as bandejas foram mantidas em casa de vegetação para promover a germinação das sementes. Durante esse período, foi realizado o controle de fungo, *Rhizoctonia spp.* com o uso de nistatina.

Após cerca de um mês, as mudas foram transferidas para um telado, onde permaneceram por alguns meses. Quando atingiram aproximadamente quatro meses de idade, as mudas foram expostas a pleno sol para aclimação, pode se observar alguns desses passos na figura 6.

Figura 6 - Imagens do experimento. A: Semeadura das progênies, B: plântulas já germinadas no telado, C: mudas já no pleno sol.



Fonte: Arquivo pessoal, 2023.

Posteriormente, foram transferidas para o campo, previamente preparado com o uso de tratores e implementos agrícolas, garantindo que as linhas fossem espaçadas a cada 3 metros.

No momento do plantio no campo, cada muda foi inserida em sulco onde foi adicionado hidrogel, com o objetivo de ajudar na retenção de umidade como pode-se observar na figura 7. Durante o estabelecimento das plantas, foram realizadas irrigações pontuais utilizando tanques e implementado o controle de formigas, tanto antes quanto após a instalação do experimento. Além disso, foi realizada adubação

de cobertura para garantir a nutrição adequada das plantas em fase inicial de crescimento.

Figura 9 - Imagens do teste de progênie. A: sulcos de plantio, B: muda com hidrogel, C: imagem aérea tirada depois de aproximadamente 8 meses de plantio, no retângulo com borda azul o experimento de *Eucalyptus robusta* e no vermelho *Eucalyptus urophylla*.



Fonte: Arquivo pessoal A e B 2023, C tirada por colaborador do experimento 2024.

1.1.8 DIVERSIDADE GENÉTICA MICROSSATÉLITES EM PORTA-ENXERTOS DE VIDEIRA

Os microssatélites (SSR) são marcadores moleculares altamente polimórficos, úteis para a análise de variabilidade genética e amplamente utilizados no melhoramento genético de plantas. Esses marcadores permitem estimar a diversidade genética, contribuindo para a seleção de genótipos mais divergentes. Neste estudo buscamos avaliar a diversidade genética de diferentes porta-enxertos de videira por meio de microssatélites, fornecendo informações relevantes para estratégias de melhoramento genético.

Coletamos amostras de folhas de oito genótipos de porta-enxertos de videira pertencentes ao Departamento de Produção Vegetal, Horticultura da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) – UNESP. O DNA foi extraído utilizando o protocolo de Doyle Doyle 1987, modificado, seguido por verificação em gel de agarose e quantificação em nanodrop, as amostras foram amplificadas com as fluorescências por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando 10 primers obtidos de estudos anteriores. Os amplicons foram preparados e sequenciados por ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), os eletroferogramas foram analisados no software Genemapper 5.

Para análise dos parâmetros genéticos foi utilizado o software Cervus para obtenção dos parâmetros de heterozigosidade observada (HO), heterozigosidade esperada (HE) e conteúdo informativo de polimorfismo (PIC) e o software R studio para construção do dendograma. Ao longo das análises três primers não apresentaram as bandas no gel de agarose, ou seja, não houve amplificação. Os dados apresentaram diferença significativa com valor de $p < 0,005$, entre os marcadores quanto a diversidade genética.

Como pode ser observado na tabela 2, o marcador VVLB01 apresentou a maior heterozigosidade observada (HO=1,0) e um número de alelos intermediário (6), sugerindo uma alta diversidade genética. O marcador VVLH54 apresentou HO=0,87 e HE=0,57, com menor número de alelos (3), indicando menor diversidade. Marcadores como VVLN16 (HO=0,62, HE=0,74, número de alelos=4) e VMCF3 (HO=0,71, HE=0,84, número de alelos=5) mostraram variabilidade moderada, enquanto VVLP60 e VVLP31 apresentaram valores de HO de 0,50, com número de alelos de 7 e 8, respectivamente, indicando uma diversidade genética relativamente mais baixa.

Tabela 2 - Número de alelos (K), heterozigosidade observada (HO), heterozigosidade esperada (HE), índice de conteúdo polimórfico (PIC), Hardy-Weinberg (HW) para cada primer (locus).

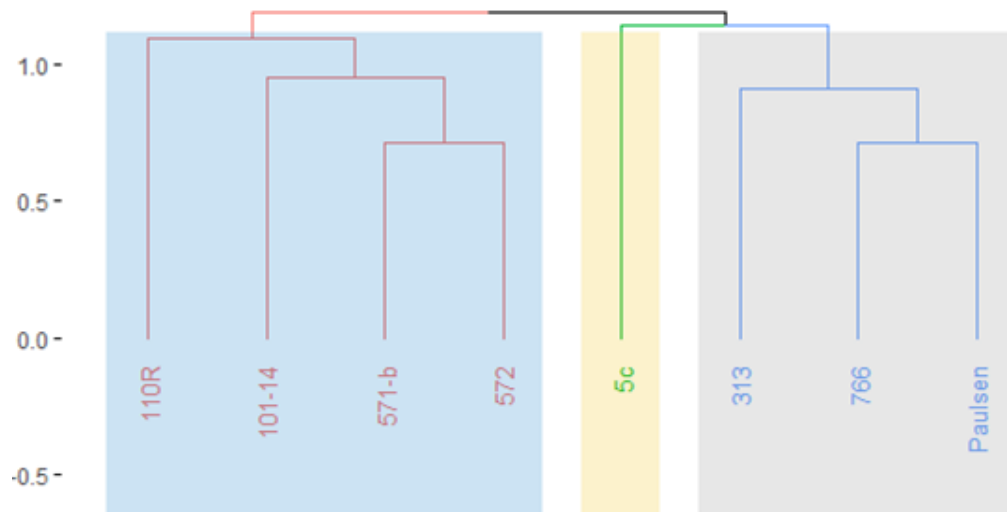
Locus	k	HO	HE	PIC	HW
VVLP31	8	0.500	0.858	0.78	ns
VVLP60	7	0.500	0.850	0.77	ns
VMCF3	5	0.714	0.846	0.752	ns
VVLB01	6	1.000	0.808	0.72	ns
VVLN16	4	0.625	0.742	0.636	ns
VVLH54	3	0.875	0.575	0.447	ns

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise de microssatélites proporcionou uma caracterização detalhada da diversidade genética dos porta-enxertos de uva, como ilustrado no gráfico (X). A variabilidade genética observada é essencial para a seleção de porta-enxertos contrastantes com características desejáveis, especialmente para programas de melhoramento genético. O dendograma apresentado permite visualizar a similaridade genética entre os diferentes porta-enxertos, facilitando a escolha de materiais genéticos com maior diversidade para cruzamentos e aprimoramento de

características específicas, como resistência a doenças, adaptação ao solo e qualidade dos frutos. Este tipo de análise molecular, utilizando marcadores como os microsatélites, é uma ferramenta muito eficaz para entender e explorar a diversidade genética nas plantas.

Gráfico 3 - Dendograma de distância genética de oito porta-enxertos de uva.



Fonte: Elaborada pelo autor.

1.1.9 TÉCNICAS DE BIOTECNOLOGIA

Entre os programas de melhoramento de diversas espécies vegetais, as ferramentas e técnicas da biotecnologia desempenham um papel crucial. A extração de DNA, a eletroforese em gel de agarose e a reação em cadeia da polimerase (PCR) são fundamentais para a realização de análises moleculares, permitem a identificação de variabilidade genética, o mapeamento de características e o melhoramento das espécies. Ao aplicar essas metodologias, os pesquisadores avançam na compreensão da diversidade genética e na melhoria genética das plantas para diversos fins agronômicos.

1.1.10 EXTRAÇÃO DE DNA VEGETAL

Para a extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) vegetal, existem diversos protocolos, além de kits comerciais que garantem boa qualidade e eficiência do material genético. Entre os métodos disponíveis, o protocolo de Doyle e Doyle (1987) é amplamente utilizado. Com algumas adaptações, ele permite obter DNA de boa qualidade tanto de plantas nativas quanto de espécies comerciais.

O processo começa com a coleta do material vegetal, etapa que exige atenção especial em espécies que produzem altos níveis de compostos fenólicos, pois esses podem interferir na extração do DNA. Nesses casos, é importante armazenar as folhas de forma adequada, como em sílica gel para remoção de umidade ou no gelo, dependendo da necessidade. No laboratório, o primeiro passo é a maceração das amostras com nitrogênio líquido, seguida pela transferência para tubos de 2,0 ml. Em seguida, adiciona-se o tampão de extração (contendo PVP-40, PVP-360, CTAB, NaCl 5M, EDTA 0,5M e Tris-HCl 1M, pH 8,0), juntamente com β -mercaptoetanol e a enzima proteinase K. As amostras são então incubadas a 60°C por 60 minutos.

Após a incubação, o material é centrifugado a 10.000 relative centrifugal force (rcf) por 10 minutos. O sobrenadante é coletado com cuidado e transferido para um novo tubo adiciona-se a solução CIA (clorofórmio:álcool isoamílico), inverte-se os tubos por aproximadamente 40 vezes e centrifuga. O sobrenadante resultante é transferido para tubos de 1,5 ml, e adiciona-se isopropanol em proporção equivalente ao volume do sobrenadante. Após misturar suavemente, as amostras são armazenadas no freezer por 2 horas.

Em seguida, centrifuga-se por 10 minutos a 10.000 rcf, e o sobrenadante é descartado com cuidado para preservar o pellet, onde está concentrado o DNA. O pellet é então lavado duas vezes com etanol 70% e uma vez com etanol 100%, realizando centrifugações de 10 minutos a 10.000 rcf após cada lavagem. Após a última etapa de centrifugação, o *pellet* é seco na capela com os tubos abertos por aproximadamente 5 minutos. Por fim, o DNA extraído é ressuspenso em água livre de nucleases, e RNase é adicionada para eliminar resíduos de RNA ainda presentes na amostra.

1.1.11 ELETROFORESE

A eletroforese em gel de agarose é uma técnica fundamental para a separação de fragmentos de DNA com base no tamanho, a técnica foi uma revolução (Lee et. al., 2012). A molécula de DNA, sendo negativa, migra em direção ao polo positivo quando submetida a um campo elétrico. As amostras são carregadas em pequenos poços formados no gel de agarose, que geralmente apresenta uma concentração de 1%, ideal para análise de DNA extraído. Para facilitar a visualização dos fragmentos, utiliza-se um corante intercalante que emite fluorescência sob luz UV.

O gel é preparado com um tampão de corrida, o qual estabiliza o pH durante o processo, e a corrente elétrica é aplicada de modo que o DNA migre do polo negativo para o positivo. Antes de pipetar as amostras, um tampão de carregamento é adicionado para corar as amostras e para promover maior densidade, permitindo que se depositem adequadamente nos poços. Para a análise, é utilizado um marcador de peso molecular, ou *leader*, que serve de referência para estimar o tamanho dos fragmentos com base no número de pares de bases.

Após a corrida, que geralmente dura cerca de 15 minutos, forma-se uma série de bandas correspondentes aos diferentes fragmentos de DNA. Essas bandas podem ser visualizadas e documentadas usando um equipamento de fotodocumentação com luz UV. A interpretação do tamanho dos fragmentos é feita comparando as bandas com a distância percorrida pelo *leader*, permitindo uma estimativa precisa do tamanho do DNA.

Essa técnica é muito utilizada em genética molecular para análise de DNA, como na verificação da qualidade do DNA extraído ou na determinação de fragmentos de interesse depois da reação em cadeia da polimerase(PCR). A eletroforese em gel de agarose é uma ferramenta essencial em diversos campos da biotecnologia e da biologia molecular (Sambrook & Russell, 2001).

1.1.12 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica essencial na biotecnologia e biologia molecular, utilizada para amplificar fragmentos específicos de

DNA, desenvolvida por Kary Mullis em 1983. A PCR permite a multiplicação de uma sequência-alvo de DNA em uma quantidade suficiente para análise, podendo ser realizada totalmente *in vitro* (LIPAY e BIANCO, 2015).

Para realizar a PCR, é necessário preparar a amostra de DNA, geralmente diluindo o DNA em uma concentração específica, como 50 ng/ μ L, e adicionando os primers, que são sequências curtas de nucleotídeos, específicas para as extremidades do fragmento a serem amplificados. O procedimento requer o uso de um master mix, composto por Taq polimerase, dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatos), e MgCl₂ para funcionamento da enzima. Além disso, utiliza-se água livre de nucleases para ajustar o volume da reação.

O processo de PCR ocorre em ciclos repetitivos em um termociclador, com três etapas principais: desnaturação, anelamento e extensão. Durante a desnaturação, a amostra é aquecida a aproximadamente 94°C, separando a dupla hélice do DNA-alvo. Na etapa de anelamento, a temperatura é reduzida (50 a 70°C) para permitir que os primers se liguem às sequências-alvo do DNA, a temperatura depende do conteúdo de citosina e guanina da sequência que será amplificada. Finalmente, na etapa de extensão, a Taq polimerase, a uma temperatura de 70-75°C, começa a sintetizar a nova fita de DNA complementar, adicionando os dNTPs a nova fita (LIPAY e BIANCO, 2015). Esse ciclo se repete por cerca de 20 a 40 vezes, com a quantidade de DNA amplificado dobrando a cada ciclo. O produto da PCR pode ser analisado em uma eletroforese para conferência das bandas.

1.1.13 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo do período do estágio pude desenvolver as diversas atividades descritas nesse relatório, além de proporcionar vivência prática em técnicas laboratoriais e de campo, como cruzamentos, implementação de testes de progênie, extração de DNA, PCR e sequenciamento que são ferramentas fundamentais para o estudo da variabilidade genética, um dos pilares do melhoramento contribuem significativamente conservação de diversas espécies vegetais. Através desse período de instrumentação, coloquei em práticas muitos conceitos teóricos da graduação, como delineamento de experimentos, análises estatísticas, fundamentos de genética

e biotecnologia, ministrados em diversas disciplinas do curso. Áreas como genética, fisiologia, bioquímica, estatística e ecologia se encontram nesse campo, reforçando a importância de uma abordagem mais integrada para lidar com os desafios associados ao desenvolvimento de variedades mais produtivas, resilientes e adaptadas às mudanças climáticas.

1.1.14 REFERÊNCIAS

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 50, n. 8, p. 521–577, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1139/w04-035>.

BORÉM, A.; MIRANDA, G. V.; FRITSCHÉ-NETO, R. Melhoria de plantas. São Paulo: Oficina de Textos, 2021.

CABI. *Eucalyptus robusta* overview. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/9658>. Acesso em: 17 nov. 2024.

CARBONELL, S. A. M.; CARVALHO, C. R. L.; PEREIRA, V. R. Qualidade tecnológica de grãos de genótipos de feijoeiro cultivados em diferentes ambientes. *Bragantia*, v. 62, p. 369-379, 2003.

CARVALHO, L. M. J. et al. Iron and zinc retention in common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) after home cooking. *Food & Nutrition Research*, v. 56, n. 1, p. 15618, 2012.

CECCARELLI, S.; GRANDO, S. Genetic diversity and plant breeding in a changing climate. In: CHALLINOR, A. J. et al. *Climate Change and Agriculture*. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 187-209.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, v. 19, p. 11-15, 1987.

GODOY, I. J. de; MORAES, S. A. de; SIQUEIRA, W. J.; PEREIRA, J. C. V. N. A.; MARTINS, A. L. de M.; PAULO, E. M. Produtividade, estabilidade e adaptabilidade de cultivares de amendoim em três níveis de controle de doenças foliares. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 34, n. 7, p. 1183–1191, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X1999000700010>.

HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: A review. *Annals of Microbiology*, v. 60, n. 4, p. 579–598, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1>.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (IPCC). *Climate Change 2021: The Physical Science Basis*. Contribution of Working Group I to the Sixth

Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press, 2021. Disponível em: <https://www.ipcc.ch/report/ar6/wg1/>. Acesso em: 15 nov. 2024.

JARVIS, D. I. et al. A training guide for in situ conservation on-farm. Bioversity International, 2000.

KHAN, W. et al. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 28, n. 4, p. 386–399, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9103-x>.

LEE, P. Y. et al. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, n. 62, p. 3923, 2012.

LIPAY, M. V. N.; BIANCO, B. *Biologia Molecular - Métodos e Interpretação*. Rio de Janeiro: Roca, 2015. E-book. p. 53. ISBN 978-85-277-2768-6. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/reader/books/978-85-277-2768-6/>. Acesso em: 10 nov. 2024.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, 1987. p. 335-350.

NIGAM, S. N.; RAO, M. J. Vasudeva; GIBBONS, R. W. Artificial hybridization in groundnut. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 1990.

PEPE, T. et al. Eucalyptus urophylla: Patterns of genetic variation and conservation strategies. *Journal of Forestry*, 2004.

SHAHZAD, S. M. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers for sustainable agricultural production. *Sustainability*, v. 13, n. 15, p. 8466, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/su13158466>.

SILVA, S. D. dos A. et al. Growth and genetic variation of Eucalyptus urograndis clones in clonal tests. *Silvae Genetica*, v. 64, n. 1–6, p. 60–66, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1515/sg-2015-0009>.

SILVEIRA, D. C. et al. Diversidade genética de acessos de feijão crioulo na região Noroeste do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, v. 25, n. 1/2, p. 133-146, 2019.