QUALIDADE DA EXTRAÇÃO DE DNA EM FOLHAS DE MAMOEIRO SOB DIFERENTES ACONDICIONAMENTOS E TEMPO DE COLETA

Fabíola Lacerda de Souza Barros[1]; Felipe Batista Pereira[1], João Pedro Moraes Almeida Campos[2], Hugo Deleon Souza[2], Rafael Nunes Almeida[1], Monique Moreira Moulin[2], Sarah Ola Moreira[1]

[1]Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Incaper). Linhares-ES; [2]Instituto Federal do Espírito Santo, Campus Alegre. Alegre, ES. *fabiola.lacerda@incaper.es.gov.br

INTRODUÇÃO

A caracterização molecular é uma ferramenta essencial no melhoramento genético vegetal e amplamente empregada na seleção de genótipos superiores. Contudo, independentemente da técnica utilizada, a qualidade dos resultados depende diretamente do estado do material vegetal coletado para extração do DNA (Carvalho *et al.*, 2019; Quiñones *et al.*, 2024). Fatores como a presença de pragas, doenças, resíduos de proteínas, compostos fenólicos e outros metabólitos secundários constituem gargalos no processo de coleta e extração, pois interferem diretamente na integridade do material genético.

Porém, a preparação adequada do material, incluindo a coleta e armazenamento, é tão crucial quanto o próprio protocolo de extração, visando cessar as atividades metabólicas celulares e evitar a degradação do DNA. Nesse contexto, diversos estudos relatam o uso de agentes dessecantes — como a sílica gel — para a manutenção da integridade tecidual. Embora essa estratégia apresente êxito em várias espécies vegetais, ela pode não produzir os mesmos efeitos positivos em outras (Quiñones *et al.*, 2024).

Para o mamoeiro (*Carica papaya* L.), o tecido comumente empregado na extração de DNA consiste em pequenos discos foliares obtidos de folhas jovens. No entanto, observa-se uma grande diversidade de protocolos para o acondicionamento e preservação dessas amostras até o momento do processamento. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade do DNA de mamoeiro obtido sob diferentes métodos de coleta, recipientes e tempos de armazenamento, visando estabelecer a estratégia mais eficiente para a obtenção de DNA de alta qualidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a retirada de material vegetal foram utilizados mamoeiros localizados na Fazenda Experimental do Incaper (FEL), Linhares-ES. Foram utilizadas folhas completamente expandidas e livres de sintomas de pragas e doenças. As folhas foram retiradas com auxílio de estilete e dispostas em caixas térmicas com gelo rígido para o transporte até o laboratório, onde as amostras foram acondicionadas e armazenadas de acordo

com os seguintes tratamentos: T1: Limbo foliar acondicionado em saco plástico de alta gramatura à vácuo e resfriado em caixa térmica com gelo rígido; T2: Limbo foliar, envolto em no papel alumínio e posteriormente embalado em saco plástico de alta gramatura à vácuo e resfriado em caixa térmica com gelo rígido; T3: Limbo foliar com pecíolo, sem embalagem, resfriado em caixa térmica com gelo rígido; T4: Fragmento de limbo foliar, envolvo em papel alumínio, posteriormente embalado em saco plástico de alta gramatura à vácuo e resfriado em caixa térmica com gelo rígido; T5: Fragmento do limbo foliar, embalado em saco plástico com retirada manual do ar e resfriado em caixa térmica com gelo rígido; T6: Fragmento do limbo, embalado em duas camadas de filtro de papel, como sílica entre as duas camadas e armazenado em envelopes de papel (testemunha); T7: Fragmento do limbo embalado em camada única de filtro de papel, e o conjunto de amostras colocados em pote plástico único, com tampa, com sílica ao fundo. Os tratamentos foram acondicionados nas condições testadas por 29 e 53 horas antes do armazenamento em ultrafreezer, à -80 ºC. As placas de gelo rígido foram trocadas com e 24 e 48h.

No laboratório de Biologia Molecular do Instituto Federal do Espírito Santo (Ifes) *Campus* Alegre, o DNA genômico foi extraído conforme o método CTAB, protocolo de Doyle e Doyle (1990), modificado por Abdelnoor (1995). Após a extração de DNA, as amostras foram quantificadas por espectrofotômetro NanoDrop. O rendimento foi determinado por medições da absorbância a 260, 280 e 230 nm, sendo a pureza do DNA foi determinada pela razão de absorbâncias 260/280 e 260/230.

Para análise estatística, as médias e o desvio padrão amostral de cada tratamento foram utilizados para comparar com o tratamento convencional (T6), considerado testemunha, dentro de cada tempo de armazenamento (29 e 53h), por meio do teste Dunnet ao nível de significância de 5%. Dentro de cada tratamento, os tempos de armazenamento foram comparados pelo Test T, ao nível de significância de 5%. As análises foram conduzidas com auxílio do programa R.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações de DNA variaram entre 343,53 ng /µL (T4, 29h) e 766,03 ng/µL (T6, 48h), uma diferença de 122,99%. Considerando cada intervalo de tempo analisado, os tratamentos T1, T5 e T7 foram semelhantes ao tratamento testemunha (T6) quanto analisados após 29h da coleta, com médias de 510,28; 547,15 e 551,38 ng /µL de DNA. Quando se adiciona mais um dia de intervalo (53h), além destes tratamentos, o T4 também se iguala à testemunha (T6) (Figura 1A). Desta forma, o uso do papel alumínio ou o armazenamento sem embalagem podem interferir na quantidade de DNA extraída. O uso do papel alumínio combinado com o uso de nitrogênio líquido é um método clássico para preservação de amostras para análise molecular (Doyle; Doyle, 1987). No entanto, para o resfriamento em caixa térmica, outras alternativas de armazenamento foram mais eficientes, como o uso de sacos plásticos de alta gramatura (com ou sem vácuo) e os filtros de papel com sílica.

Para três tratamentos (T2, T4 e T7), o maior de intervalo de tempo entre a coleta e o armazenamento a -80 ºC (53h) promoveu o aumento da quantidade de DNA extraído. Porém, para o T7, as razões A260/A280

e A260/A230 foram menores com o acréscimo do armazenamento (Figura 1B e 1C), o que indica que essa maior concentração pode ter sido originada de uma contaminação por polissacarídeos e compostos fenólicos que precipitaram juntamente com o DNA.

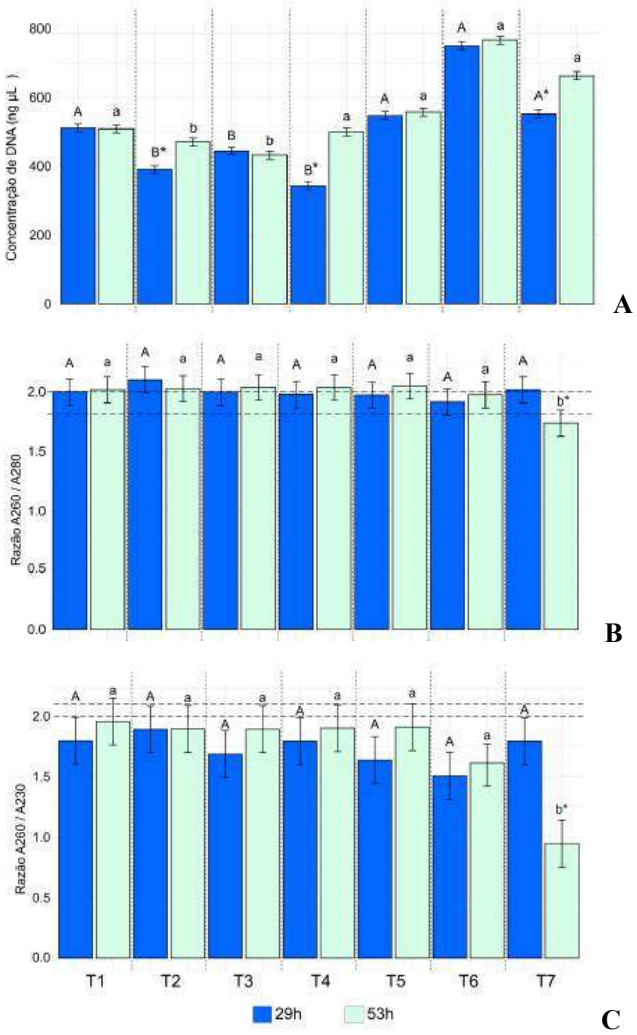


Figura 1 - Concentração de DNA (A), razão A260/A280 (B) e razão A260/A230 (C) de mamoeiro obtido em amostras em diferentes embalagens e tempos de armazenamento (29 e 53 h). Letras maiúsculas indicam diferenças em relação ao controle (T6) no intervalo de 29h, e as minúsculas no intervalo de 53h, pelo teste de Dunnett. Asteriscos indicam diferenças entre os tempos dentro do mesmo tratamento pelo teste t. T1: Limbo foliar acondicionado em saco plástico à vácuo e resfriado em caixa térmica com gelo rígido; T2: Limbo foliar, envolto em papel alumínio e embalado em saco plástico à vácuo e resfriado em caixa térmica com gelo rígido; T3: Limbo foliar com pecíolo, sem embalagem, resfriado em caixa térmica com gelo rígido; T4: Fragmento de limbo foliar, envolvo em papel alumínio, embalado em saco plástico à vácuo e resfriado em caixa térmica com gelo rígido; T5: Fragmento do limbo foliar, embalado em saco plástico com retirada manual do ar e resfriado em caixa térmica com gelo rígido; T6: Fragmento do limbo, embalado em duas camadas de filtro de papel, como sílica entre as duas camadas e sem resfriamento (testemunha); T7: Fragmento do limbo embalado em camada única de filtro de papel, e o conjunto de amostras colocados em pote plástico único, com tampa, com sílica ao fundo, sem resfriamento.

A faixa da razão A260/A280 considerada ótima é entre 1,8 e 2,0 (Carvalho *et al*., 2019). Amostras obtidas dentro desta faixa indicam que a pureza do DNA. Após 29h de armazenamento, os tratamentos T2 e T7 ficaram acima deste intervalo. Após 53h, apenas o tratamento testemunha (T6) ficou na faixa ótima. Estes resultados sugerem que o maior tempo de armazenamento provoca redução da pureza do DNA extraído, no entanto, esta diferença não é estatística, pois, comparado tanto com a testemunha quanto dentro de cada tratamento, apenas o T7-53h foi estatisticamente inferior.

Para a razão A260/A230, a faixa ótima é entre 2,0 e 2,2 (Carvalho *et al*., 2019). Todos os tratamentos, após 29h ou 53h de armazenamento, ficam abaixo desta faixa, variando entre 0,947 (T7-53h) e 1,955 (T1 – 53h). Nesta variável, o tratamento controle, para os dois tempos de armazenamento, teve média inferior a 1,8 indicando quantidades significativas de contaminação da amostra. Exceto para o T7, o maior tempo de armazenamento (53h) parece promover maior pureza do DNA. Do ponto de vista estatístico, no entanto, a única diferença observada foi para o tratamento T7-53h, assim como para a razão A260/A280.

Apesar dos valores obtidos para a razão A260/A230 não serem satisfatórios, Nakum *et al*. (2019) validaram a qualidade do DNA extraído por meio de outros critérios alternativos: caracterização física/visual do pelete final do DNA (paletes escuros indicam oxidação fenólica); eletroforese em gel de agorose (revelação de bandas limpas sem arraste característico de degradação); e validação funcional, ou seja, se o DNA isolado amplifica uma seleção de primers gerando amplicons reprodutíveis e nítidos. Tendo bons resultados nestes testes adicionais, mesmo amostras com impureza um pouco inferiores à faixa ótima podem ser utilizadas para análises moleculares.

CONCLUSÃO

Com exceção do tratamento T7-53h, as demais condições testadas tiveram similaridade estatística, tanto com o tratamento testemunha quanto entre os tempos de armazenamento, para todas as variáveis analisadas. A escolha do melhor método e do tempo de armazenamento pode ser baseada na praticidade de manuseio e tempo necessário para o transporte até ultrafreezer (-80 ºC), sem comprometer a qualidade do DNA genômico.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (Fapes). Edital Fapes/Seag - Inovagro Nº 03/ 2024 (TO: 1114/2024) pelo apoio financeiro e concessão de bolsas.

REFERENCIAS

ABDELNOOR, R.V.; DE BARROS, E.G; MOREIRA, M.A. Determination of genetic diversity within Brazilian soybean germplasm using random amplified polymorphic DNA techniques and comparative analysis with pedigree. **Revista Brasileira de Genética**, v. 18, p. 265-273, 1995.

CARVALHO, M.S; NOIA, L.R.; FERREIRA, M.F.S.; FERREIRA, A. DNA de alta qualidade isolado a partir do córtex de *Euterpe edulis* Mart. (Arecaceae). **Ciência Florestal**, v. 29, n. 1, p. 396-402, 2019. DOI: https://doi.org/10.5902/1980509824130

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Washington, v. 1, p. 13-15,1990.

NAKUM, A.; KUVAD, R.; CHUDASAMA, K.; THAKER, V. Protocol for DNA extraction and molecular characterization in medicinal plant *Carica papaya* L. varieties. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 8, n. 2, p. 514-520. Disponível em: https://www.phytojournal.com/archives/view-pdf/7607/8-1-88. Acesso em: 13 set. 2026.

QUIÑONES, K.J.O.; GENTALLAN JR., R.P.; TIMOG, E.B.S.; VERACRUZ, J.R.A.; MACABECHA, C.G.A.; PAPA, I.A.; CORONADO, N.B.; BARTOLOME, M.C.B.; CERIBO, D.B.; MADAYAG, R.E.; MAGTOLTOL, J.B.; SIENES, R.K.A.; ALVARAN, B.B.S.; BORROMEO, T.H. Liquid-nitrogen-free CTAB DNA extraction method from silica-dried specimens for next-generation sequencing and assembly. **MethodsX,** v. 12, p. 102758, 2024. DOI: https://doi.org/10.1016/j.mex.2024.102758