



COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE COLETA E DE EXTRAÇÃO DE DNA EM FOLHAS DE *Apeiba tibourbou* (MALVACEAE)

José Carlito Gonçalves de Medeiros^{1*}, Sheila Valeria Alvares Carvalho¹, Maria Gabriela Monteiro de Carvalho Andrade¹, Iara Maria dos Santos Costa Luna¹, Luan Henrique da Silva Ferro¹, Dayse Dayane Lins da Silva¹, Marília Freitas de Vasconcelos Melo¹, Gildemberg Amorim Leal Junior¹

Universidade Federal de Alagoas – Campus de Engenharias e Ciências Agrárias¹

* jcmedeiros2015@gmail.com

RESUMO

Estudos envolvendo análises genéticas são de vital importância para espécies florestais, permitindo expandir o conhecimento sobre a diversidade e conservação das espécies nativas. Para obter sucesso nas análises moleculares, a obtenção de DNA de boa qualidade é um passo fundamental. *Apeiba tibourbou* Aubl. apresenta desafios específicos na extração de DNA devido às suas características moleculares. Um dos principais obstáculos é a presença de compostos fenólicos que pode dificultar sua purificação e interferir em reações enzimáticas essenciais, como a PCR, reduzindo a eficiência dos experimentos moleculares. Nesta seara, o presente trabalho teve como objetivo comparar diferentes métodos de coleta de material vegetal e de extração de DNA visando a obtenção de material genético adequado para análises moleculares de *A. tibourbou*. Foram utilizados três métodos distintos de preservação das amostras coletadas, e dois protocolos de extração do DNA: Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB) 2% e 4%. Para caracterizar a presença e qualidade do DNA extraído das folhas de *A. tibourbou*, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 0,8%, a 90V por 40 minutos. Após isso, o gel de agarose foi analisado em transiluminador sob luz ultravioleta. Os resultados desta pesquisa indicam que folhas de *A. tibourbou* coletadas em sílica gel e uso de tampão CTAB a 2% para extração de DNA, contribuem para uma melhor homogeneidade das bandas do DNA genômico.

Palavras-chave: Protocolo, CTAB, Espécies florestais.

INTRODUÇÃO

Estudos de genética de populações e filogenia em espécies florestais dependem da obtenção de DNA genômico de alta qualidade, o que exige métodos eficientes tanto de coleta quanto de preservação de amostras foliares. Em plantas neotropicais, a seleção do protocolo de conservação é essencial, visto que metabólitos secundários e a umidade podem comprometer a integridade do DNA (FERES *et al.*, 2005).

Apeiba tibourbou Aubl., conhecida popularmente como pente-de-macaco ou pau-jangada é uma espécie nativa de florestas tropicais e possui interesse ecológico e econômico (LORENZI, 2016). Esta espécie está presente nos domínios fitogeográficos da Floresta Amazônica, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal, tendo ainda uma ampla distribuição pela América do Sul e Costa Rica (FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2020). Por ser uma espécie que foi amplamente explorada, principalmente para confecção de jangadas ao longo do litoral brasileiro, análises genéticas são de vital importância, permitindo expandir o conhecimento sobre a diversidade e conservação dessa espécie (AZÊVEDO *et al.*, 2019). Entretanto, estudos moleculares com *A. tibourbou* ainda são limitados, o que corrobora na escassez de protocolos otimizados para extração de DNA de qualidade da espécie.

Para o sucesso nas análises moleculares, a obtenção de DNA de boa qualidade é um passo fundamental, sendo que a coleta, preservação das amostras e escolha do método de extração do DNA constituem pontos a serem estabelecidos. Coleta em gelo e protocolos tradicionais como o Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB), descrito por Doyle e Doyle (1987), são amplamente utilizados por apresentarem bom rendimento e baixo custo, especialmente em folhas frescas. Contudo, em espécies com alto teor de compostos fenólicos ou polissacarídeos, a eficiência pode ser reduzida, exigindo a adoção de modificações na forma de coleta e alterações nos protocolos padrões ou até mesmo a utilização de kits comerciais. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo comparar diferentes métodos de coleta de material vegetal e protocolos de extração de DNA visando a obtenção de material genético adequado para análises moleculares de *A. tibourbou*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material vegetal

Folhas de cinco espécimes adultos de *A. tibourbou* foram coletadas no *Arboretum* da Universidade Federal de Alagoas, *Campus* A. C. Simões [(Lat.: 9°33'15" S; Long.: 35°46'8" O (Coordenadas UTM, zona 25 S)] e transportadas para a Clínica Fitossanitária da universidade supracitada – *Campus* de Engenharias e Ciências Agrárias (CECA), onde as extrações de DNA foram realizadas. O número de registro da atividade de acesso ao patrimônio genético no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético – SISGen é AEDDD43 (Lei 13.123/2015). A coleta foi realizada em um único dia (abril de 2025), durante o turno da manhã e o DNA extraído no mesmo dia. Foram utilizados três métodos distintos de coleta das amostras: no primeiro, o material vegetal de cada espécie foi coletado e identificado em sacos de papel e acondicionada em recipiente contendo sílica gel; no segundo método, as amostras foram identificadas e coletadas utilizando sacos plásticos e acondicionadas em caixa térmica; e no terceiro e último método, as amostras foram acondicionadas em tubos cilíndricos de plástico poliestireno (tubo Falcon) contendo solução CTAB concentrado (10%).

Extração de DNA

Foram testados dois protocolos de extração, o CTAB a 2% e o CTAB a 4%, conforme a tabela a seguir (Tabela 1).

Tabela 1. Concentrações utilizadas, métodos de coleta e códigos das amostras dos protocolos utilizados para a extração de DNA genômico de *A. tibourbou*.

Protocolo 1			Protocolo 2		
Método de coleta	Concentração CTAB	Amostras	Método de coleta	Concentração CTAB	Amostras
Sílica gel	2%	SG2_1	Sílica gel	4%	SG4_1
Sílica gel	2%	SG2_2	Sílica gel	4%	SG4_2
Sílica gel	2%	SG2_3	Sílica gel	4%	SG4_3
Sílica gel	2%	SG2_4	Sílica gel	4%	SG4_4
Sílica gel	2%	SG2_5	Sílica gel	4%	SG4_5
Caixa térmica	2%	CA2_1	Caixa térmica	4%	CA4_1
Caixa térmica	2%	CA2_2	Caixa térmica	4%	CA4_2
Caixa térmica	2%	CA2_3	Caixa térmica	4%	CA4_3
Caixa térmica	2%	CA2_4	Caixa térmica	4%	CA4_4
Caixa térmica	2%	CA2_5	Caixa térmica	4%	CA4_5
CTAB 10%	2%	CT2_1	CTAB 10%	4%	CT4_1
CTAB 10%	2%	CT2_2	CTAB 10%	4%	CT4_2
CTAB 10%	2%	CT2_3	CTAB 10%	4%	CT4_3
CTAB 10%	2%	CT2_4	CTAB 10%	4%	CT4_4
CTAB 10%	2%	CT2_5	CTAB 10%	4%	CT4_5

SG2_1 - SG2_5 (amostras coletadas em Sílica Gel e protocolo de extração CTAB a 2%); CA2_1 - CA2_5 (amostras coletadas em Caixa térmica e protocolo de extração CTAB a 2%); CT2_1 - CT2_5 (amostras coletadas em solução de CTAB a 10% e protocolo de extração CTAB a 2%); SG4_1 – SG4_5 (amostras coletadas em Sílica Gel e protocolo de extração CTAB a 4%); CA4_1 – CA4_5 (amostras coletadas em Caixa térmica e protocolo de extração CTAB a 4%); CT4_1 – CT4_5 (amostras coletadas em solução de CTAB a 10% e protocolo de extração CTAB a 4%).

No protocolo de extração 1 (CTAB 2%), o tampão CTAB (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM; NaCl 1,4 M; CTAB 2%; e PVP 1%) foi previamente aquecido em banho-maria a 65° C. Em cada cadinho foram macerados 60 mg de tecido vegetal de *A. tibourbou*, obtido da região internervural. Para facilitar a maceração, foi utilizado nitrogênio líquido, sendo em seguida, adicionado 800 µL do tampão de extração contendo 0,2% de β-mercaptoetanol e PVP (aproximadamente ¼ de espátula 3mm), macerando por 1 minuto. O macerado foi transferido para microtubos de 1 mL e acondicionados em gelo.

Finalizado o processo de maceração, as amostras foram colocadas em banho maria (65° C) por 50 minutos, sendo vertidas 5 vezes a cada 10 minutos. Em seguida, foram retiradas do banho-maria e acondicionadas em temperatura ambiente por 5 minutos. Passado esse tempo, foram adicionados 500 µL de clorofórmio: álcool

isoamílico (24:1), sendo então vertidos por 5 minutos. Após isso, foi realizada uma centrifugação por 10 minutos, a 12000 RPM, a 4° C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo contendo isopropanol gelado (proporção 1:1), sendo acondicionados em freezer *overnight*. As amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos, a 12000 RPM, a 4° C. O *pellet* obtido foi lavado com 500 µL de etanol 70%, seguido de nova centrifugação com as mesmas conformações anteriores. O sobrenadante foi vertido, e o *pellet* colocado a secar em estufa de ventilação forçada por 50 minutos a 60° C. O DNA foi ressuspensionado em 50 µL de tampão TE contendo RNase (10mg.ml⁻¹), sendo então acondicionados em freezer.

O protocolo de extração 2 (CTAB 4%), seguiu os mesmos procedimentos do protocolo de extração 1, diferindo apenas na concentração do Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB 4%).

Eletroforese

A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 0,8%, à 90V por 40 minutos, para caracterizar a presença e qualidade do DNA extraído das folhas de *A. tiburou*. Foram utilizados 4 µL do DNA genômico de cada uma das amostras, 3 µL de corante *SYBR Green* e 3 µL de água destilada autoclavada. O gel de agarose foi analisado em transiluminador sob luz ultravioleta e fotografado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os protocolos revelaram diferenças na qualidade de DNA obtido. O protocolo de extração CTAB a 2% exibiu definições de bandas melhores, quando comparadas com as do CTAB a 4% (Figuras 1A e 1B), com bandas bem definidas em todas as amostras no gel.

Dentro do método de extração utilizando CTAB a 2%, houve diferenças nos tipos de coletas dos tecidos vegetais, em que o acondicionamento das folhas em sílica gel (Figura 1A: amostras 1-5) promoveu maior homogeneidade das bandas de DNA, quando comparadas com o acondicionamento em caixa térmica (amostras 6-10) e o CTAB concentrado (amostras de 11-15). Apesar disso, as três formas de coleta apresentam boa conformação nas bandas de DNA obtidas.

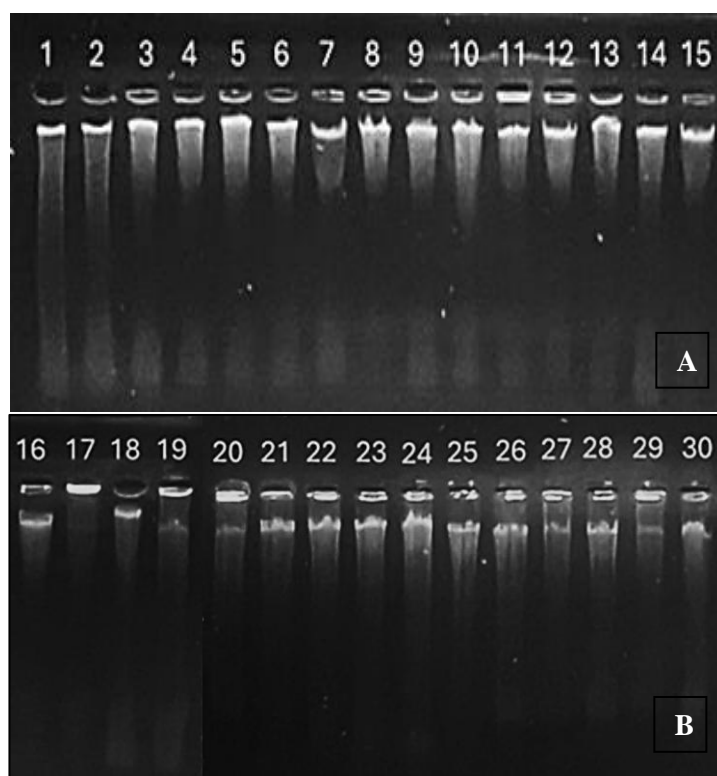


Figura 1A: Eletroforese em gel de agarose a 0,8% das amostras extraídas a partir do método CTAB a 2%, coletados em sílica [1 (SG2_1); 2 (SG2_2); 3 (SG2_3); 4 (SG2_4); 5 (SG2_2)], Caixa térmica [6 (CA2_1); 7 (CA2_2); 8 (CA2_3); 9 (CA2_4); 10 (CA2_5)], CTAB concentrado [11 (CT2_1); 12 (CT2_2); 13 (CT2_3); 14 (CT2_4); 15 (CT2_5)]. Figura 1B: Eletroforese em gel de agarose a 0,8% das amostras extraídas a partir do método CTAB a 4%, coletados em sílica [16 (SG4_1); 17 (SG4_2); 18 (SG4_3); 19 (SG4_4); 20 (SG4_5)], Caixa térmica [21 (CA4_1); 22 (CA4_2); 23 (CA4_3); 24 (CA4_4); 25 (CA4_5)], CTAB concentrado [26 (CT4_1); 27 (CT4_2); 28 (CT4_3); 29 (CT4_4); 30 (CT4_5)].

O protocolo 2 (CTAB 4%), apresentou heterogeneidade quando à integridade das bandas de DNA, nos três métodos de acondicionamento das amostras (Figura 1B). Verifica-se bandas fracas e presença de arrastes, o que pode indicar degradação significativa ou DNA em baixa concentração. O resultado do material acondicionado em sílica gel (amostras 16-20) não trouxe resultado satisfatório, apresentando bandas com diferentes conformações. Já a coleta em caixa térmica (amostras 21-25) obteve menor variação na conformação das bandas, em comparação com as outras duas formas de coleta. Por sua vez, as amostras coletadas em tubo contendo CTAB concentrado (amostras 26-30) obtiveram resultado intermediário, com certa variação nas bandas obtidas.

Conforme dito por Azêvedo *et al.* (2019), o isolamento de DNA vegetal pode ser realizado por diferentes metodologias, que dependem das peculiaridades da espécie, ou seja, para cada espécie podem ser necessárias algumas adaptações. Em espécies de plantas da família Malvaceae, polissacarídeos e outros metabólitos secundários estão presentes em alta quantidade, representando um problema na extração de DNA de alta qualidade (ECHEVARRIA MACHADO, 2005). Nesta pesquisa, a coleta em sílica gel ocasionou maior qualidade do DNA extraído, o que provavelmente está ligado à sua eficácia em secar rapidamente tecidos foliares, inibindo a atividade de enzimas DNases e retardando reações de senescência celular e oxidação dos fenóis (HATAMI-GIGLOO *et al.*, 2013; SEMAGN, 2014; MARK *et al.* 2024).

CONCLUSÕES

Amostras de folhas de *A. tibourbou* coletadas em sílica gel e extraídas com tampão CTAB a 2%, avaliadas por eletroforese em gel de agarose evidenciaram melhor homogeneidade das bandas de DNA genômico, quando comparadas com amostras extraídas a partir de tampão CTAB a 4% e demais formas de coleta. Entretanto, análises complementares das quantificações do DNA e amplificação por PCR são necessários para avaliar a viabilidade do material genético para análises moleculares.

REFERÊNCIAS

- AZÊVEDO, H. S. F. S.; RUFINO, P. B.; AZEVEDO, J. M. A.; SILVA, L. M.; WATD, L. H. O.; CAMPOS, T. Preservação e maceração do tecido do folheto do açaí amazônico para obtenção de DNA genômico. **Revista Biociência**, Uberlândia, MG, v. 35, n. 4, p. 1188–1197, 2019.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. (org.). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11–15, 1987.
- ECHEVARRIA MACHADO, I. de la C.; SANCHEZ CACH, L. A.; HERNÁNDEZ ZEPEDA, C.; RIVERA MADRID, R. L. B.; MORENO VALENZUELA, O. A. A simple and efficient method for isolation of DNA in high mucilaginous plant tissues. **Molecular Biotechnology**, v. 31, p. 129–135, 2005.
- FERES, F.; SOUZA, A. P.; AMARAL, M. C. E.; BITTRICH, V. Avaliação de métodos de preservação de amostras de plantas de savanas neotropicais para a obtenção de DNA de alta qualidade para estudos moleculares. **Brazilian Journal of Botany**, v. 28, n. 2, p. 277–283, abr. 2005.
- FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2020. Disponível em: <http://www.reflora.jbrj.gov.br>. Acesso em: 8 jun. 2025.
- HATAMI-GIGLOO, S.; MORTAZAVIAN, S.; HATAMI-GIGLOO, M.; GHORBANI, M. Senescence process and oxidative stresses induce changes in plant genomic DNA quality. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 4, p. 383–387, 2013.
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras**. Jardim Botânico Plantarum, v. 2, 2016.
- MARK, D.; TAIRO, F.; NDUNGURU, J.; KWEKA, E.; SAGGAF, M.; BACHWENKIZI, H.; CHIUNGA, E.; LUSANA, J. L.; SIKAZWE, G.; MAGHEMBE, R. Assessing the effect of sample storage time on viral detection using a rapid and cost-effective CTAB-based extraction method. **Plant Methods**, v. 20, n. 64, p. 1–16, 2024.
- SEMAGN, K. Leaf Tissue Sampling and DNA Extraction Protocols. **In: Methods in Molecular Biology**, Clifton (NJ), v. 1115, p. 53–67, 2014.