

Regulação transcricional induzida pelo nitrogênio e seus efeitos sobre a produtividade e o acúmulo de amido em raízes tuberosas de batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.)

Melissa Barbosa Fonseca Moraes^{1,2}; Matheus Martins Daúde¹; Marcos Antônio Alves Moraes¹; Solange Aparecida Ságio^{1,3}; Leonardo Santos Collier⁴; Domingos Bonfim Ribeiro dos Santos^{2,5}; Márcio Antônio da Silveira³; Horllys Gomes Barreto^{1,2,3*}

¹Laboratório de Análises Moleculares (LAM), Departamento de Ciências da Vida, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, TO, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, TO, Brasil.

³Programa de Pós-Graduação em Agroenergia Digital, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, TO, Brasil.

⁴Laboratório de Solos Pesquisa e Desenvolvimento, Departamento de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brasil

⁵Laboratório de Solos e Resíduos Agroindustrial - LASOR, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, TO, Brasil.

*Autor correspondente:

horllys@uft.edu.br

Resumo

O nitrogênio (N) desempenha papel central na regulação do metabolismo do carbono e na biossíntese de amido em culturas amiláceas. Este estudo investigou os efeitos de diferentes doses de nitrogênio, D0 (controle), D1 (dose recomendada) e D2 (dobro da dose recomendada), sobre o crescimento, a produtividade, a composição bioquímica e a expressão gênica em batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), cultivar 'Duda'. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e em campo. As avaliações na casa de vegetação foram realizadas aos 30, 45, 60 dias após o plantio (DAP), enquanto a avaliação em campo ocorreu aos 240 DAP. A expressão de sete genes-chave da via do amido foi analisada por RT-qPCR aos 45 DAP. Os resultados indicaram que, aos 30 DAP, não houve diferenças na biomassa, caracterizando fase de estabelecimento. Aos 45 DAP, o nitrogênio induziu resposta transcricional rápida e dependente da dose, com indução de genes envolvidos nas etapas iniciais (*IbSUS*, *IbAGPase* e *IbAATP*), e nas etapas finais (*IbGBSSI*, *IbSSII*, *IbSBEI* e *IbISAI*) da biossíntese de amido, sugerindo regulação coordenada da via. Aos 60 DAP,

observou-se redirecionamento metabólico sob altas doses de N, com aumento da síntese proteica e crescimento da parte aérea em detrimento da raiz. Contudo, ao final do ciclo, aos 240 DAP, a dose D2 promoveu maior produtividade de raízes (55,42 t ha⁻¹) e maior rendimento estimado de etanol (11.159 L ha⁻¹), sem comprometer o teor de amido. Os resultados demonstram que o nitrogênio atua de forma dinâmica e integrada ao longo do ciclo, modulando a expressão gênica, a partição de carbono e o desempenho agrônomico. A cultivar 'Duda' apresenta elevada eficiência metabólica sob alta disponibilidade de N, destacando o manejo nitrogenado como estratégia-chave para maximizar produtividade e potencial bioenergético da cultura.

Palavras-chave: Expressão gênica; RT-qPCR; Culturas amiláceas; Biocombustíveis; Bioetanol.

Introdução

A batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) é uma cultura de elevada importância alimentar e industrial, destacando-se como fonte de carboidratos e matéria-prima para bioetanol e bioprodutos de interesse industrial (Lyu et al., 2021; Meng; Wang; Si, 2022). Entre seus principais atributos, o acúmulo de amido em raízes tuberosas constitui um fator determinante para a produtividade e a qualidade, sendo influenciado por condições ambientais e pelo manejo nutricional.

O nitrogênio (N) exerce papel central no crescimento vegetal, participando da síntese de proteínas, da fotossíntese e da assimilação de carbono, além de regular a partição de fotoassimilados entre crescimento vegetativo e armazenamento (Meng et al., 2023; Yao et al., 2020). Dessa forma, a disponibilidade de N influencia não apenas o desenvolvimento da planta, mas também o acúmulo de amido em órgãos de reserva, por meio de ajustes metabólicos associados ao balanço carbono/nitrogênio.

Além dos efeitos fisiológicos, evidências recentes indicam que o nitrogênio atua como regulador transcricional de genes envolvidos na biossíntese do amido, modulando a expressão de enzimas-chave relacionadas à biossíntese, ramificação e organização do polímero (Fan et al., 2023; Han et al., 2024; Sun et al., 2024a). Alterações na disponibilidade de N podem desencadear respostas coordenadas na expressão gênica, resultando em modificações no fluxo de carbono e, conseqüentemente, na produtividade e na qualidade das raízes tuberosas.

Apesar dos avanços recentes, ainda persistem lacunas na compreensão dos mecanismos moleculares que conectam o suprimento de nitrogênio à regulação

gênica em batata-doce, especialmente quanto à integração entre respostas transcricionais precoces e alterações fisiológicas ao longo do ciclo da cultura (He et al., 2021). Embora o nitrogênio seja reconhecido como um importante sinal regulador capaz de modular processos metabólicos em plantas (Han et al., 2024), ainda são escassos os estudos que elucidam como essa sinalização se integra às respostas ao N e regula a expressão de enzimas-chave da biossíntese de amido em tecidos de reserva (Peng et al., 2025; Yao et al., 2020).

Nesse contexto, o presente estudo adotou a cultivar brasileira 'Duda', desenvolvida pela Universidade Federal do Tocantins. Esse genótipo combina elevado teor de matéria seca (40,4%) com produtividade média de 65,5 t ha⁻¹ em solos tocantinenses (Silveira et al., 2014a), destacando-se como material promissor para fins industriais e bioenergéticos (Alves; Lima; Pôrto Junior, 2018). Mais recentemente, foi identificado como o material com melhor equilíbrio entre acúmulo de biomassa e teor de amido (24%) entre genótipos industriais (Momenté et al., 2025), consolidando-se como modelo promissor para estudos biotecnológicos (De Oliveira et al., 2025). Esse conjunto de atributos, associado à elevada eficiência metabólica, posiciona a 'Duda' como uma cultivar estratégica para investigar os mecanismos de regulação transcricional que sustentam o desempenho agrônomico e o rendimento industrial ao longo do ciclo.

Parte-se da hipótese de que o suprimento de nitrogênio modula de forma coordenada a expressão de genes-chave da biossíntese do amido e que essa reprogramação transcricional, detectável nos estágios iniciais de desenvolvimento, constitui um dos principais mecanismos associados ao incremento da produtividade e do rendimento de etanol ao final do ciclo. Para testar essa hipótese, foi analisada a expressão de sete genes-alvo (*IbSSII*, *IbGBSSI*, *IbSUS*, *IbAGPase*, *IbSBEI*, *IbAATP* e *IbISA1*), por RT-qPCR aos 45 dias após o plantio (DAP), integrando esses padrões de regulação às respostas fisiológicas, bioquímicas e produtivas obtidas em condições de campo até a colheita.

As análises foram realizadas em um desenho temporal inédito para a cultura da batata-doce, imediatamente após a segunda aplicação de nitrogênio em cobertura, com amostragens conduzidas em 4, 24 e 48 horas após a adubação, permitindo avaliar a dinâmica precoce da resposta transcricional ao nitrogênio. Essa abordagem integrada contribui para elucidar a regulação molecular do metabolismo do amido, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de estratégias de manejo nutricional mais eficientes e sustentáveis na cultura da batata-doce.

Material e métodos

Caracterização da área experimental e infraestrutura laboratorial

Os experimentos em campo e em casa de vegetação foram conduzidos na área experimental do campus de Palmas da Universidade Federal do Tocantins (UFT) (10°10'46"S, 48°21'26"W; 220 m de altitude). As análises fisiológicas, bioquímicas e agronômicas foram realizadas no Laboratório de Sistemas de Produção de Energia a partir de Fontes Renováveis (LASPER) e no Laboratório de Solos e Resíduos Agroindustriais (LASOR), enquanto as análises moleculares foram conduzidas no Laboratório de Análises Moleculares (LAM). Durante o período experimental (28 de novembro de 2023 a 28 de julho de 2024; correspondente a 240 dias após o plantio – DAP), as condições climáticas apresentaram temperaturas variando de 20,5 a 36,3 °C, com predominância na faixa de 24 a 30 °C ao longo do ciclo. A umidade relativa variou de 30% a 100%. Os dados meteorológicos foram obtidos a partir de registros do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), disponíveis em <https://tempo.inmet.gov.br>.

Delineamento experimental

Foram conduzidos dois experimentos independentes, um em casa de vegetação e outro em campo, utilizando a cultivar de batata-doce 'Duda', desenvolvida pelo Programa de Melhoramento Genético da Universidade Federal do Tocantins, com aptidão para produção de etanol (Embrapa Hortaliças, 2023; Silveira et al., 2014b). Ambos os experimentos foram implantados em 28 de novembro de 2023. O experimento em casa de vegetação teve duração de 60 dias após o plantio (DAP), enquanto o experimento em campo foi conduzido até a colheita final, aos 240 DAP.

Os tratamentos foram compostos por diferentes níveis de adubação nitrogenada: D0 (ausência de nitrogênio – controle), D1 (dose recomendada com base na análise de solo) e D2 (dobro da dose recomendada). As doses foram definidas para representar condições contrastantes de deficiência, adequação e excesso de nitrogênio, condições estas amplamente associadas a alterações metabólicas no acúmulo de amido em raízes de reserva (Duan et al., 2021; Han et al., 2024).

Os experimentos conduzidos em casa de vegetação e campo foram desenvolvidos utilizando o mesmo delineamento experimental. Cada tratamento foi composto por quatro repetições biológicas por tratamento, sendo cada repetição constituída por um pool de quatro plantas. As análises moleculares (RT-qPCR) foram

realizadas com amostras provenientes do experimento em casa de vegetação, aos 45 DAP, em triplicata técnica, conforme as diretrizes MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (Bustin et al., 2009, 2025) .

Em função da elevada mobilidade do nitrogênio no solo, no experimento em campo os tratamentos foram aplicados em faixas independentes, a fim de evitar interferência entre as doses. Cada faixa correspondeu a um tratamento (D0, D1 ou D2) e foi composta por 40 plantas, organizadas em quatro fileiras de 10 plantas. O espaçamento adotado foi de 0,30 m entre plantas e 1,0 m entre fileiras.

O experimento em casa de vegetação foi conduzido utilizando sacos plásticos de cultivo (22 cm de diâmetro e 31 cm de altura), contendo 20 kg de solo peneirado em cada um. Cada tratamento foi composto por 60 plantas, distribuídas uniformemente.

Preparo do solo, adubação e manejo cultural

O solo utilizado em ambos os experimentos foi classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico típico, de textura média, característico do bioma Cerrado. Amostras compostas foram coletadas na camada de 0–20 cm antes da implantação dos ensaios e submetidas à análise química e granulométrica, a qual indicou solo de textura predominantemente arenosa (77,87% de areia), baixa matéria orgânica (1,36%) e baixos teores de fósforo (0,83 mg dm⁻³) e potássio (0,11 cmol dm⁻³), além de pH levemente ácido (5,45 em CaCl₂), fornecendo subsídios técnicos para a definição das recomendações de calagem e adubação. Os resultados detalhados da análise de solo encontram-se apresentados no material suplementar (Fig. S1).

No experimento conduzido em campo, o preparo do solo foi realizado 30 dias antes do plantio, incluindo calagem, aração, gradagem e formação das leiras. A adubação foi estabelecida com base na análise química do solo e nas recomendações agronômicas para culturas tuberosas em solos do Cerrado brasileiro (Embrapa, 1995).

A adubação de base consistiu na aplicação de 160 kg ha⁻¹ de P₂O₅, utilizando superfosfato simples, e 90 kg ha⁻¹ de K₂O, na forma de cloreto de potássio. A adubação potássica em cobertura foi complementada com 20 kg ha⁻¹ de K₂O aos 30 dias após o plantio (DAP). O nitrogênio foi aplicado na forma de sulfato de amônio, conforme os níveis experimentais definidos no estudo: D0 (ausência de nitrogênio), D1 (dose recomendada) e D2 (dobro da dose recomendada). Na D1, foram aplicados 30 kg ha⁻¹ de N na adubação de base, seguidos por duas aplicações em cobertura de 35 kg ha⁻¹ de N aos 30 e 45 DAP, respectivamente, enquanto a D2 correspondeu ao

dobro dessas quantidades. O parcelamento da adubação nitrogenada foi adotado visando reduzir perdas por lixiviação em função da elevada fração arenosa do solo.

No experimento conduzido em casa de vegetação, o solo utilizado no preenchimento dos sacos de cultivo foi coletado na mesma área experimental utilizada no experimento de campo, sendo previamente seco ao ar, peneirado e homogeneizado. As quantidades de fertilizantes foram ajustadas proporcionalmente ao volume de solo por unidade experimental, mantendo-se as mesmas relações utilizadas no experimento de campo. Foram aplicados, por saco, 8,88g de fósforo no plantio, 0,346 g de cloreto de potássio no plantio e 1,552 g em cobertura, bem como 1,5 g de sulfato de amônio na adubação de base e 1,75 g em cobertura aos 30 e 45 dias após o plantio. A adubação foi realizada manualmente e de forma localizada, seguida de irrigação leve, visando favorecer a incorporação dos nutrientes e reduzir possíveis perdas.

As práticas de manejo cultural foram padronizadas entre os dois ambientes. A irrigação foi realizada por aspersão, sendo ajustada para manter a umidade do solo próxima à capacidade de campo. O controle de plantas daninhas foi realizado por capinas manuais, e o controle de pragas e insetos foi efetuado por meio de aplicação de defensivos químicos, quando necessário.

Avaliações experimentais

As avaliações experimentais integraram abordagens fisiológicas, agronômicas e moleculares, conduzidas de forma complementar para caracterizar os efeitos de diferentes doses de nitrogênio sobre o crescimento, a composição química, a produtividade e a expressão gênica em batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). As coletas foram realizadas aos 30, 45, 60 e 240 dias após o plantio (DAP), em diferentes tecidos, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Resumo das avaliações experimentais realizadas nos diferentes tempos de amostragem

Tempo (DAP)	Ambiente	Tecidos coletados	Tipo de avaliação	Variáveis analisadas
30 DAP	Casa de vegetação	Raiz e parte aérea	Fisiológicas	Massa seca
45 DAP	Casa de vegetação	Raiz	Molecular	Expressão gênica (RT-qPCR)
60 DAP	Casa de vegetação	Raiz e parte aérea	Fisiológicas	Massa seca e proteína
240 DAP	Campo	Raiz e parte aérea	Fisiológica/Agronômica	Massa seca, proteína, amido, produtividade e etanol

Avaliações fisiológicas e agronômicas

Massa seca (MS)

A quantificação da biomassa foi realizada com o objetivo de acompanhar a dinâmica de crescimento e o acúmulo de matéria seca sob diferentes doses de nitrogênio. As coletas aos 30 e 60 dias após o plantio (DAP) foram realizadas em plantas cultivadas em sacos plásticos, sob condições de casa de vegetação, enquanto a coleta final, aos 240 DAP, foi realizada em plantas conduzidas em campo. Em cada tempo de amostragem, os tecidos coletados foram imediatamente pesados para determinação da massa fresca (MF). Posteriormente, as amostras foram secas em estufa de circulação forçada a 65 °C por 72 h, ou até atingirem massa constante, para determinação da massa seca (MS), conforme metodologia descrita pela Embrapa, (2017).

A partir dos valores de MF e MS, foi calculado o percentual de matéria seca (%MS), conforme a equação:

$$\% \text{ MS} = \frac{\text{MS}}{\text{MF}} \times 100$$

Determinação do nitrogênio total e proteína bruta

O teor de nitrogênio total (%N) foi determinado em amostras secas e moídas da parte aérea e das raízes, utilizando o método de Kjeldahl. O procedimento consistiu na digestão de aproximadamente 0,2 g de amostra em ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄), na presença de catalisadores (Na₂SO₄ e CuSO₄), seguida de destilação em meio alcalino (NaOH) e titulação do destilado com solução padrão de ácido clorídrico (HCl), conforme descrito por Bremner, (1960). Os resultados foram expressos em porcentagem de nitrogênio com base na matéria seca (%N). A partir do teor de nitrogênio total, o teor de proteína bruta (PB%) foi estimado utilizando o fator de conversão 6,25 (Conklin-brittain et al., 1999), considerando que as proteínas contêm, em média, 16% de nitrogênio. A proteína bruta foi calculada pela equação:

$$\text{PB (\%)} = \text{N (\%)} \times 6,25$$

Determinação do teor de amido

O teor de amido nas raízes foi determinado por espectroscopia no infravermelho próximo (NIR), utilizando o equipamento NIR 900 (FemWin 900). As amostras foram previamente secas em estufa de circulação forçada a 65 °C por 72 h, moídas até a obtenção de material homogêneo e acondicionadas em cubetas

apropriadas para leitura. As análises foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando modelo de calibração específico para determinação de amido. Os valores foram obtidos diretamente pelo equipamento e expressos em porcentagem em base fresca (%), conforme fornecido pelo software FemWin.

Produtividade de raízes

Na colheita final, realizada aos 240 dias após o plantio (DAP), foi determinada a produtividade de raízes como principal parâmetro de desempenho agrônômico da cultura. A massa fresca das raízes foi obtida na área útil de cada parcela e utilizada para estimar a produtividade, com extrapolação para hectare, conforme descrito por Melo et al., (2020). A produtividade foi calculada pela equação:

$$\text{Produtividade (t ha}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Massa fresca de raízes (Kg)}}{\text{Área útil (m}^2\text{)}} \times 10.000$$

Estimativa do rendimento de etanol

A estimativa do rendimento potencial de etanol (L ha⁻¹) foi realizada a partir do teor de amido nas raízes e da produtividade por hectare, considerando a conversão do amido em etanol, conforme metodologia proposta por Silva, (2013). A estimativa foi calculada por meio da equação:

$$\text{PE} = (10,349 \times \text{CA} - 89,349) \times \text{P}$$

Em que:

PE – Produção estimada de etanol em L.ha⁻¹.

CA – concentração de amido em %.

P – Produtividade por hectare.

Avaliações moleculares

As amostras destinadas às análises moleculares por RT-qPCR foram coletadas exclusivamente em tecidos de raízes, incluindo raízes tuberosas em desenvolvimento, aos 45 dias após o plantio (DAP). Para capturar a resposta transcricional de curto prazo à adubação nitrogenada, as coletas foram realizadas em três tempos específicos após a segunda adubação de cobertura de N: 4 horas (4 h), 24 horas (24 h) e 48 horas (48 h). Após a coleta, os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C até o momento da extração de RNA.

Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA total foi realizada a partir de raízes coletadas aos 45 DAP, utilizando um protocolo de extração com ácido fenol previamente otimizado para tecidos de batata-doce por Gonçalves et al., (2021), com modificações descritas por Moraes et al., (2025). As etapas detalhadas do protocolo de extração encontram-se apresentadas no material suplementar (Fig. S2). A concentração e a pureza do RNA foram avaliadas por espectrofotometria (NanoDrop™ One, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA), com base nas razões A260/A280 e A260/A230, enquanto a integridade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1%.

As amostras consideradas adequadas foram tratadas com DNase I utilizando o kit TURBO DNA-free™ (Ambion, Austin, Texas, USA), visando à remoção de DNA genômico residual. A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA total utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania), de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA obtido foi armazenado a -20 °C até a realização das análises de RT-qPCR.

Identificação e seleção dos genes de referência e genes-alvo

Os genes utilizados neste estudo foram selecionados com base em revisão sistemática da literatura científica nas bases Web of Science e Scopus, considerando estudos que investigaram a regulação transcricional do metabolismo do amido em batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) (Moraes et al., 2025). Foram analisados sete genes-alvo associados à biossíntese e à modulação do amido: *IbSSII* (*starch synthase II*), *IbGBSSI* (*granule-bound starch synthase I*), *IbSUS* (*sucrose synthase*), *IbAGPase* (*ADP-glucose pyrophosphorylase*), *IbSBEI* (*starch branching enzyme I*), *IbAATP* (*ADP/ATP translocator*) e *IbISAI* (*isoamylase I*). Para fins de organização funcional, esses genes foram agrupados de acordo com sua posição na via metabólica em dois conjuntos: (i) genes associados ao fornecimento de carbono e ao controle do fluxo metabólico (etapas iniciais), incluindo *IbSUS*, *IbAGPase* e *IbAATP*, e (ii) genes relacionados à síntese e à organização estrutural do amido (etapas finais), como *IbGBSSI*, *IbSSII*, *IbSBEI* e *IbISAI*. A seleção dos genes-alvo considerou sua função descrita na via metabólica do amido, evidências de expressão em tecidos de armazenamento e sua recorrência em estudos envolvendo batata-doce e espécies amiláceas relacionadas (Fan et al., 2023; Han et al., 2024; Lai et al., 2016; Sun et al., 2024b).

Análise *in silico* – identificação da sequência gênica

As sequências nucleotídicas dos genes-alvo envolvidos na biossíntese e metabolismo do amido em *Ipomoea batatas* (L.) Lam. foram obtidas a partir do banco de dados GenBank (NCBI), utilizando números de acesso previamente descritos na literatura para *IbSSII* (Sun et al., 2024), *IbGBSSI* e *IbISAI* (Lai et al., 2015), *IbSUS* (Han et al., 2024), *IbAGPase* (Fan et al., 2023; Seo et al., 2015), *IbSBEI* (Song et al., 2022) e *IbAATP* (Wang et al., 2016). A identidade e especificidade das sequências gênicas foram confirmadas utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul et al., 1990), por meio da comparação com o banco de dados Sweetpotato Genomics Resource, disponibilizado pela Michigan State University (EUA). Para os genes de referência (*IbGAP* e *IbARF*), foram utilizadas sequências previamente validadas por (Moraes et al., 2025).

Desenho de primers

Os primers utilizados nas reações de RT-qPCR para os genes-alvo foram redesenhados com base nas sequências gênicas previamente identificadas no banco Sweetpotato Genomics Resource, utilizando o software OligoPerfect (Thermo Fisher Scientific; <https://www.thermofisher.com>). Para os genes de referência (*IbGAP* e *IbARF*), foram utilizados os primers previamente validados por Moraes et al., (2025). As propriedades físico-químicas dos primers, incluindo temperatura de melting (T_m), tamanho do amplicon e ausência de estruturas secundárias, foram avaliadas utilizando a ferramenta OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies; <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). As sequências dos primers, eficiências de amplificação (E%) e características dos amplicons encontram-se descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Características dos primers utilizados nas análises de RT-qPCR, incluindo número de acesso, sequência, temperatura de melting (T_m), tamanho do amplicon (bp), coeficiente de determinação (R^2) e eficiência de amplificação (E%) para os genes de referência e genes-alvo analisados.

Gene name	Accession number	Primer sequence (5´-3´)	T_m (°C)	Amplicon n (bp)	R^2	E (%)
<i>IbGAP</i>	JX177362.1	Fw: CGCTCACTTGAAGGCTGGT	64,4 63,9	151	0,999	91,7

		Rv:				
		AGGAGCAAGGCAGTTGGTAG				
		Fw:				
		TGTTGGTGGTCAGGACAAGA	63,3			
<i>IbARF</i>	JX177359.	Rv:	61,2	150	1,000	88,1
	1	CTCAATTCATCCTCATTGAGCA				
		T				
		Fw:				
		TGAAGTCCAGTCAAGTGATGC				
		C	60,5			
<i>IbSSII</i>	U44126.1	Rv:	61,1	107	1,000	94,9
		TGCCATTGAAGAGGAGGAAGG				
		A				
		Fw:				
		ATGAGGGTGGGAATGGCAGCA	61,8			
<i>IbGBSS</i>	AB009300.	Rv:	61,4	81	1,000	87,4
<i>I</i>	1	GACCCACCTCACATCCCACA				
		Fw:				
		AACGACCCTCCAACCCGAAA	61,7			
<i>IbSUS</i>	G505.t1	Rv:	61,9	97	1,000	89,4
		CACATGCTCAGCGGTGTCAC				
		Fw:				
		AGCCACAGAGAAACAGATGC	60,6			
<i>IbAGPa</i>	AJ252316.	Rv:	61,9	80	0,996	97,3
<i>se</i>	1	TGAGACCAAAGGCAGTGGCA				
		Fw:				
		CGGCTTTGATGTTGGACAAGG	61,5			
<i>IbSBEI</i>	DQ066739	T	61,4	120	0,996	90,6
	.1	Rv:				
		AGGAAACGCAGGACTTCCCA				
		Fw:				
		GGCGAAACCGTTTGATGGGT	61,5			
<i>IbAATP</i>	AB035153.	Rv:	60,8	89	1,000	93,8
	1	TCTGAGCAACCAACGAAGGC				

		Fw:				
<i>IbISA1</i>	DQ074643	GTGGTGGTGGAGAAGCCTCT	61,4			
	.1	Rv:	61,7	104	0,998	93,6
		TTGATCCCGCCGTCTCTAGC				

Análise de RT-qPCR

As reações de RT-qPCR foram realizadas em termociclador ABI PRISM 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Foster City, California, USA), utilizando o reagente PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania) e o cDNA obtido neste estudo. Cada reação foi preparada em volume final de 10 µL, contendo 1,0 µL de cDNA (diluído 1:5), 0,2 µL de cada primer (10 µM), 5,0 µL de Master Mix e 3,6 µL de água livre de DNase/RNase. Foram utilizadas quatro repetições biológicas e três repetições técnicas por amostra. As condições de amplificação consistiram em 2 min a 50 °C, 5 min a 95 °C, seguidos por 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C. Curvas de dissociação (*melt curves*) foram geradas ao final de cada reação (60–95 °C; incremento de 1 °C a cada 5 s) para verificar a especificidade dos produtos amplificados. Os valores de ciclo de quantificação (Cq) foram obtidos por meio do software 7500 System SDS v2.0.5 (Thermo Fisher Scientific, Foster City, California, USA), utilizando limiar de fluorescência fixado em 0,1. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo modelo matemático proposto por Pfaffl, (2001), considerando as eficiências dos conjuntos de primers. A normalização dos dados foi realizada utilizando a média geométrica dos genes de referência *IbGAP* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) e *IbARF* (*ADP-ribosylation factor*), previamente validados por Moraes et al., (2025) como os genes mais estáveis para a condição estudada. O estudo de validação encontra-se depositado no database RGeasy (De Souza et al., 2024)

Análise Estatística

Os dados provenientes das avaliações fisiológicas, bioquímicas, agronômicas foram inicialmente submetidos à análise de variância (ANOVA), considerando-se o delineamento experimental adotado em cada ensaio. Para os dados envolvendo apenas os níveis de adubação nitrogenada, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software Sisvar versão 5.6 (Ferreira, 2019).

Os dados de expressão gênica obtidos por RT-qPCR (Pfaffl, 2001) também foram submetidos à ANOVA. Nesse caso, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, devido ao maior número de tratamentos resultante da combinação entre doses de nitrogênio e tempos de avaliação, o que gerou múltiplas médias experimentais. A utilização do teste de Scott-Knott permitiu uma melhor discriminação e interpretação dos grupos formados, facilitando a visualização dos resultados de expressão gênica.

Os gráficos foram gerados no software RStudio (Posit Team, 2025), utilizado o pacote ggplot2 (Wickham, 2016).

Resultados

Avaliações Agronômicas e Bioquímicas

Massa seca da raiz e parte aérea (30, 60 e 240 DAP)

Aos 30 dias após o plantio (DAP), a massa seca da raiz não foi significativamente influenciada pelas doses de nitrogênio ($p = 0,5705$), apresentando médias de 1,52 g (D2), 1,73 g (D0) e 1,89 g (D1) por planta. De forma semelhante, a massa seca da parte aérea também não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos ($p = 0,1128$), com valores médios de 12,30 g (D0), 16,08 g (D2) e 18,82 g (D1) por planta (Fig. 1A–B). As imagens representativas da parte aérea e do sistema radicular evidenciam crescimento vegetativo semelhante entre os tratamentos neste estágio inicial (Fig. 2A–F).

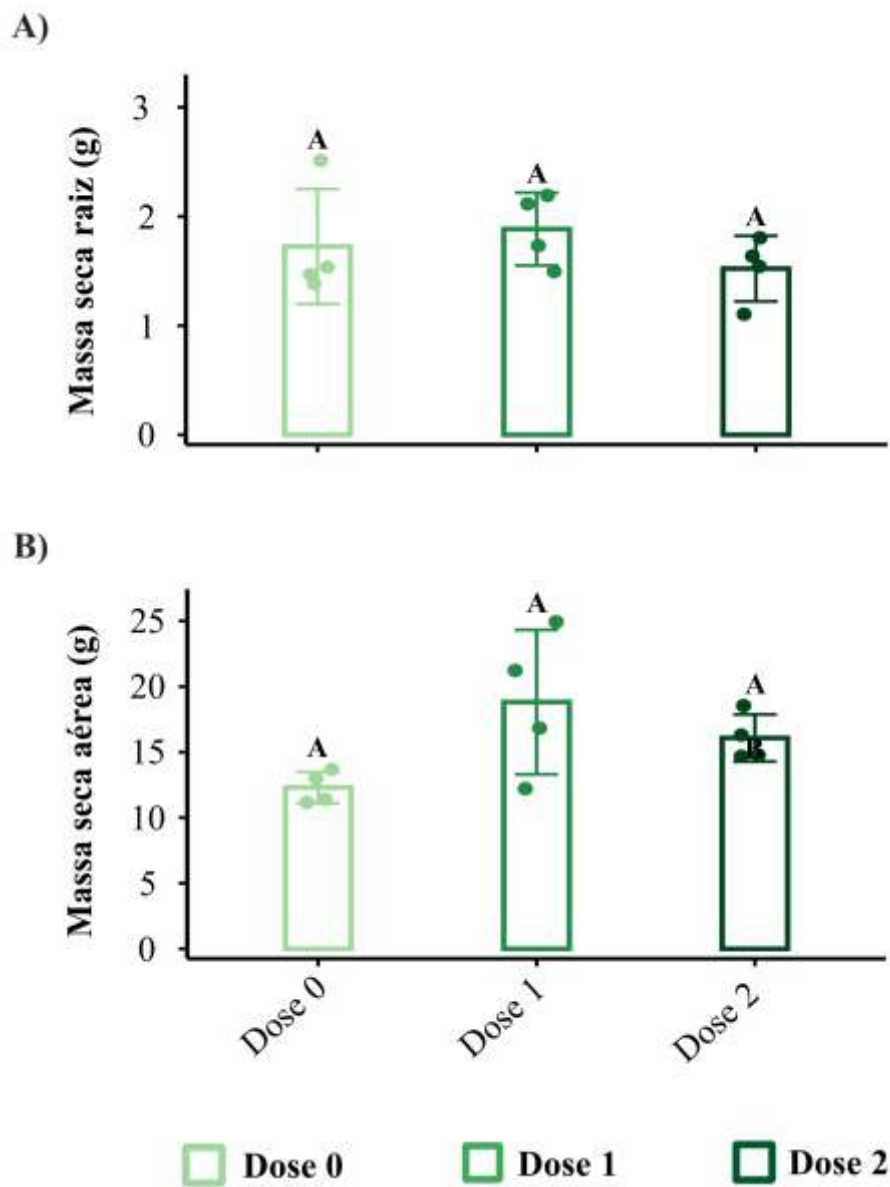


Figura 1. Massa seca da raiz (A) e da parte aérea (B) de plantas de batata-doce aos 30 dias após o plantio (DAP) sob diferentes doses de nitrogênio. Barras representam média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

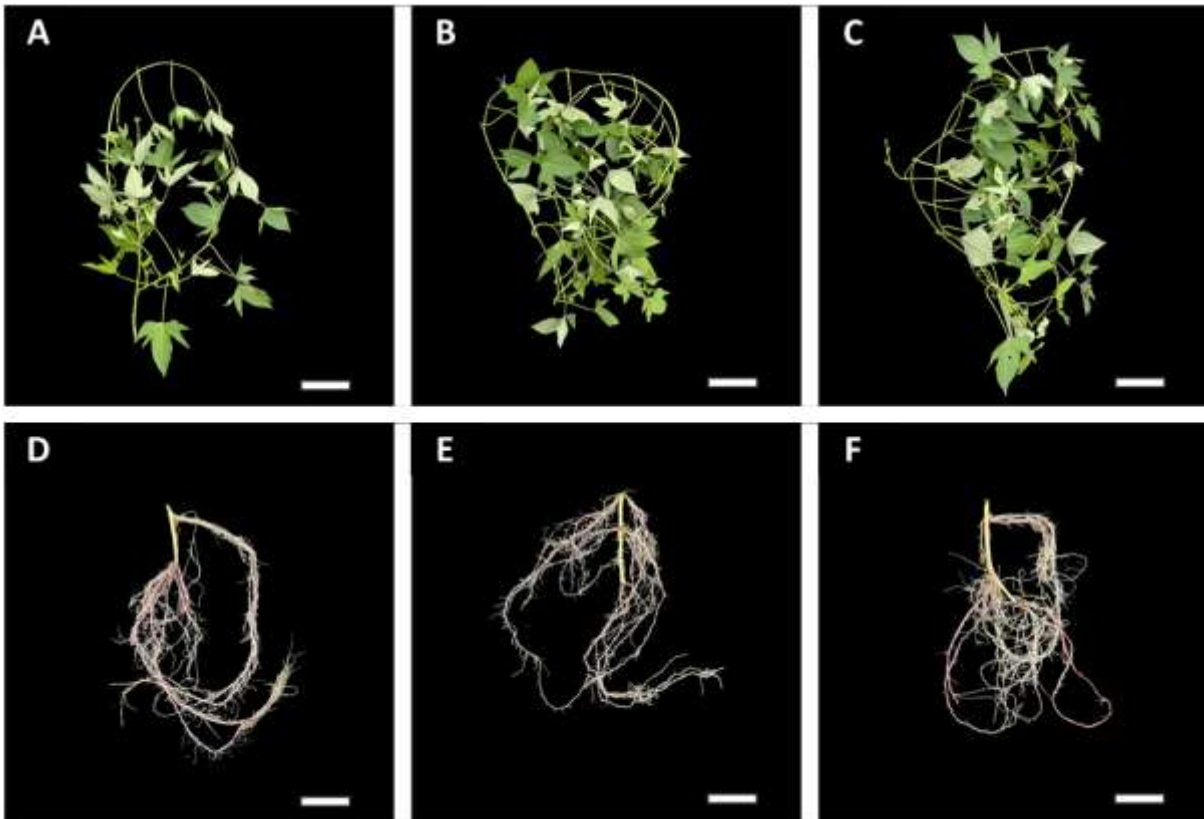


Figura 2. Imagens representativas da parte aérea (A–C) e do sistema radicular (D–F) de plantas de batata-doce aos 30 dias após o plantio (DAP) sob diferentes doses de nitrogênio. Os tratamentos correspondem à Dose 0 (A, D), Dose 1 (B, E) e Dose 2 (C, F). Barras de escala: 10 cm.

Aos 60 dias após o plantio (DAP), a massa seca da raiz foi significativamente influenciada pelas doses de nitrogênio, com menor valor observado em D2 (12,50 g), diferindo de D1 (18,75 g) e D0 (22,50 g), que também diferiram entre si (Fig. 3A). Essas diferenças foram acompanhadas por alterações visuais no desenvolvimento radicular entre os tratamentos, evidenciando modificações no desenvolvimento e na distribuição das raízes em resposta às doses de nitrogênio aplicadas (Fig. 4A–C). Para a massa seca da parte aérea, também foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, com maior acúmulo em D1 (176,25 g), seguido por D2 (95,00 g) e D0 (75,00 g), sendo D1 superior aos demais tratamentos (Fig. 3B).

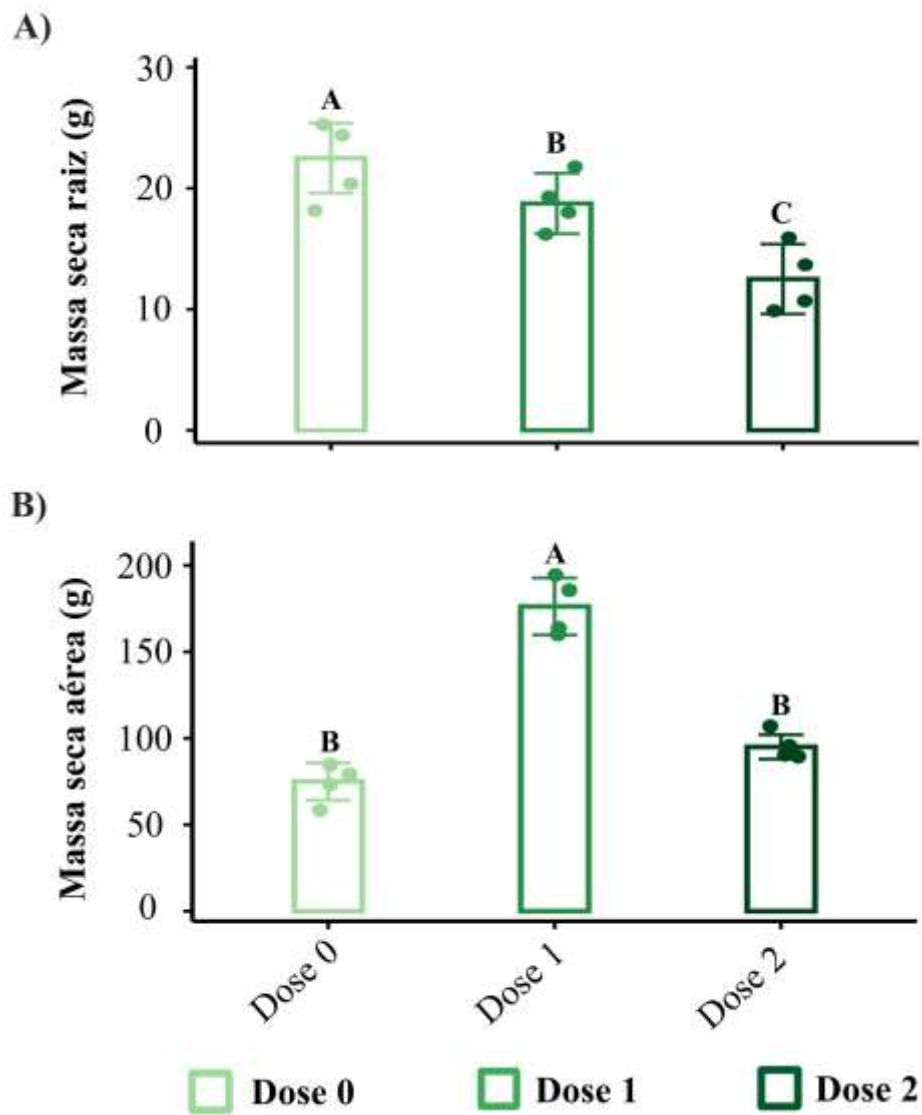


Figura 3. Massa seca da raiz (A) e da parte aérea (B) de plantas de batata-doce aos 60 dias após o plantio (DAP) sob diferentes doses de nitrogênio. Barras representam média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

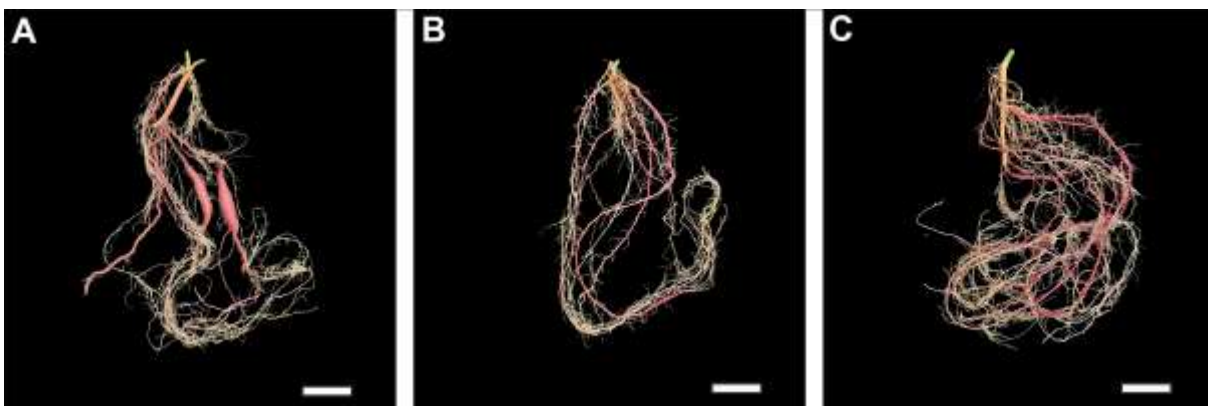


Figura 4. Imagens representativas do sistema radicular de plantas de batata-doce aos 60 dias após o plantio (DAP) sob diferentes doses de nitrogênio. Os tratamentos correspondem à Dose 0 (A), Dose 1 (B) e Dose 2 (C). Observam-se diferenças no desenvolvimento, distribuição e arquitetura radicular entre os tratamentos em resposta às doses de nitrogênio aplicadas. Barras de escala: 10 cm.

Aos 240 dias após o plantio (DAP), a massa seca da raiz foi significativamente influenciada pelas doses de nitrogênio, com maior acúmulo observado em D2 (27,81 t ha⁻¹), diferindo de D0 (10,90 t ha⁻¹), enquanto D1 (15,01 t ha⁻¹) apresentou comportamento intermediário (Fig 5A). Para a massa seca da parte aérea, também foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, com maiores valores em D2 (29,25 t ha⁻¹), seguidos por D1 (27,87 t ha⁻¹) e D0 (19,40 t ha⁻¹) (Fig 5B). A relação raiz/parte aérea foi significativamente afetada pelas doses de nitrogênio, com maior valor em D2 (0,97), menor em D1 (0,55) e comportamento intermediário em D0 (0,60), evidenciando alterações na alocação de biomassa entre os órgãos (Fig. 5C).

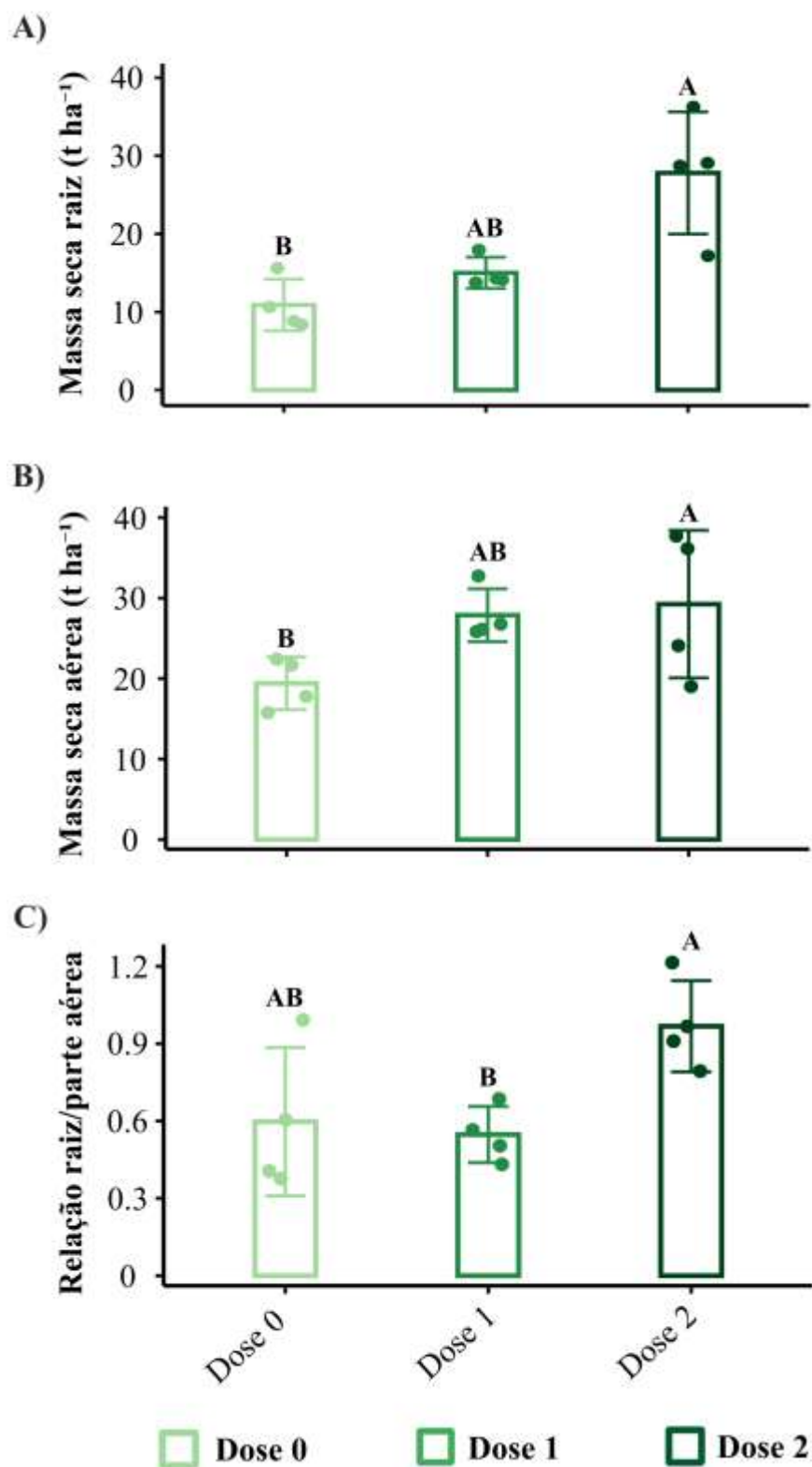


Figura 5. Massa seca da raiz (A), massa seca da parte aérea (B) e relação raiz/parte aérea (C) de plantas de batata-doce aos 240 dias após o plantio (DAP), sob diferentes doses de nitrogênio. Barras representam média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Produtividade, teor de amido e estimativa de etanol (240DAP)

Aos 240 dias após o plantio (DAP), a produtividade da raiz foi significativamente influenciada pelas doses de nitrogênio, com maior valor observado em D2 (55,42 t ha⁻¹), diferindo de D0 (24,21 t ha⁻¹), enquanto D1 (34,66 t ha⁻¹) apresentou comportamento intermediário, não diferindo dos demais tratamentos (Fig. 6A). De forma semelhante, a produtividade da parte aérea também foi significativamente afetada pelas doses de nitrogênio ($p = 0,0274$), com maiores valores em D2 (106,25 t ha⁻¹), diferindo de D0 (67,50 t ha⁻¹), enquanto D1 (100,25 t ha⁻¹) apresentou comportamento intermediário (Fig. 6B).

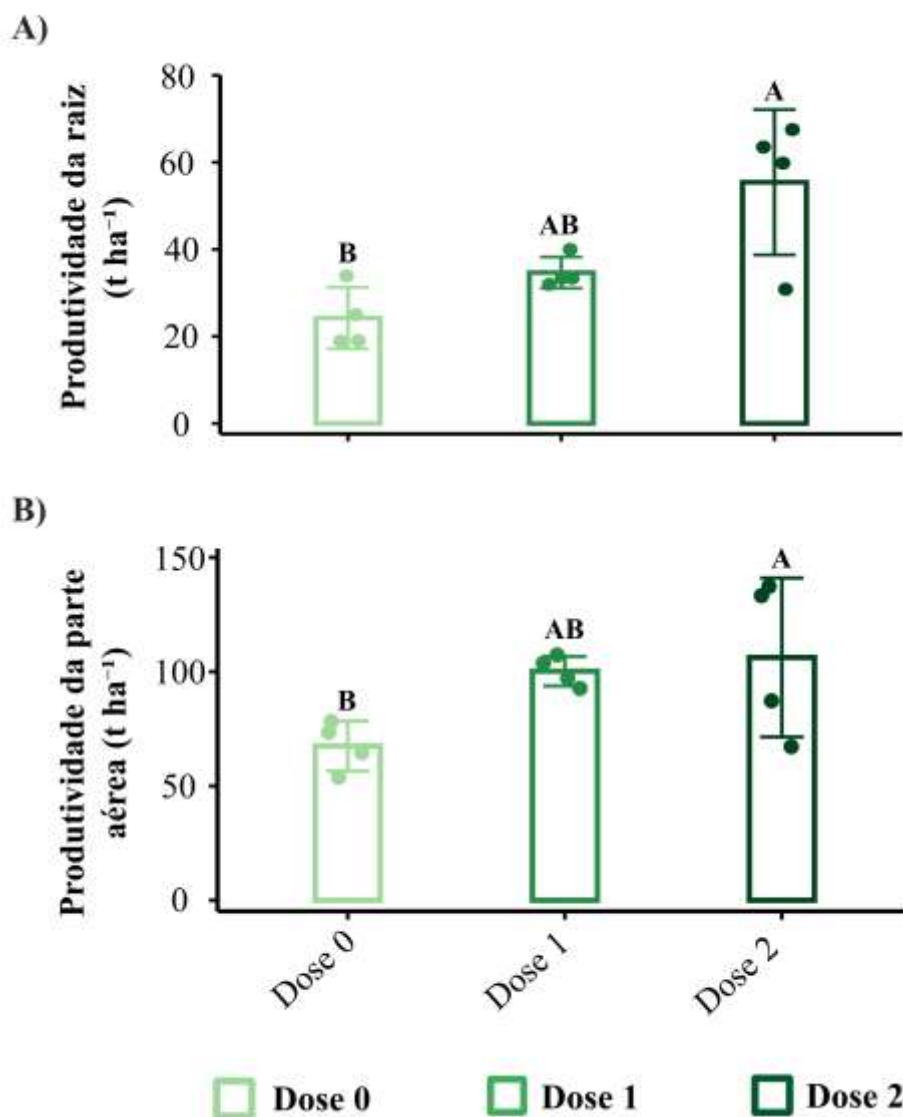


Figura 6. Produtividade da raiz (A) e da parte aérea (B) de plantas de batata-doce aos 240 dias após o plantio (DAP) sob diferentes doses de nitrogênio. As barras representam a média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O teor de amido foi significativamente influenciado pelas doses de nitrogênio, com menores valores observados em D1 (23,54%), diferindo de D0 (27,07%) e D2 (28,34%), que não diferiram entre si (Fig. 7A).

De forma semelhante, o rendimento estimado de etanol também foi significativamente afetado pelas doses de nitrogênio, com maior valor observado em D2 (11.159 L ha⁻¹), diferindo de D0 (4.638 L ha⁻¹) e D1 (5.362 L ha⁻¹), que não diferiram entre si (Fig. 7B).

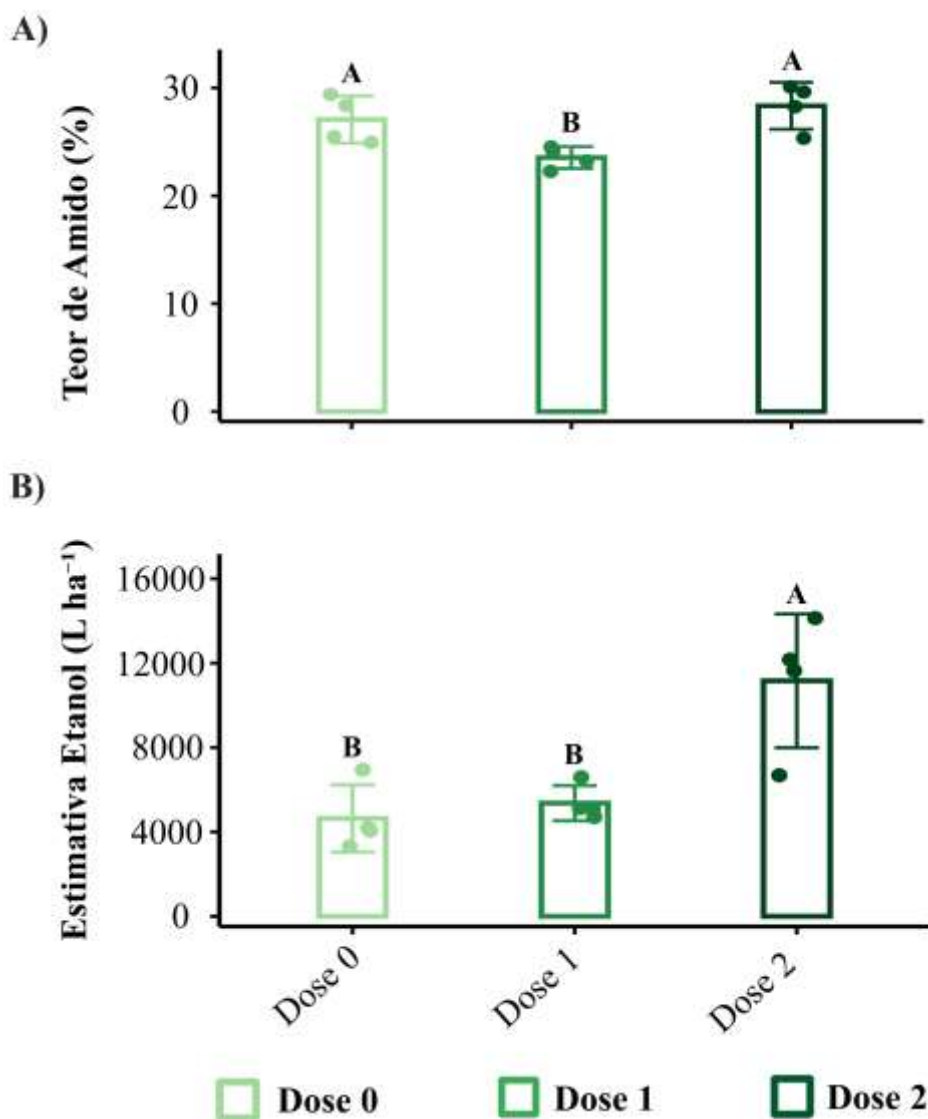
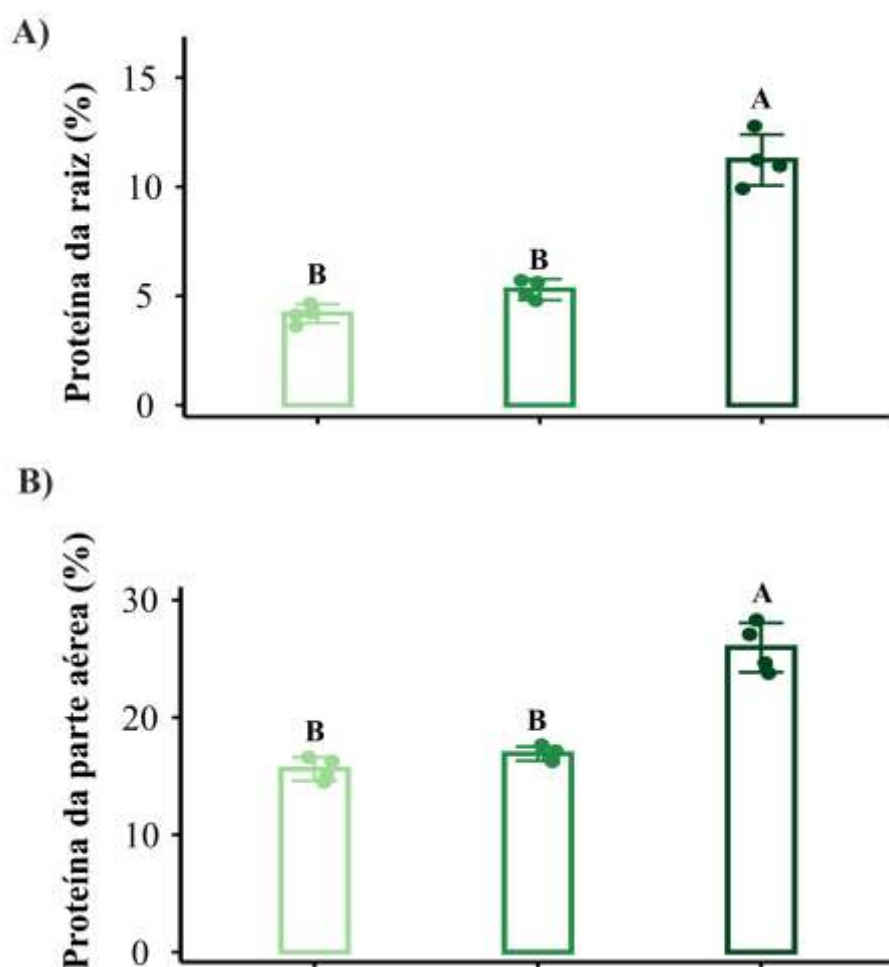


Figura 7. Teor de amido (A) e rendimento estimado de etanol (B) de raízes tuberosas de batata-doce aos 240 dias após o plantio (DAP) sob diferentes doses de nitrogênio. As barras representam a média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Proteína da raiz e parte aérea (60 e 240 DAP)

O teor de proteína na raiz, aos 60 dias após o plantio (DAP), foi significativamente influenciado pelas doses de nitrogênio, com maior valor observado em D2 (11,23%), diferindo de D0 (4,19%) e D1 (5,29%), que não diferiram entre si (Fig. 8A). De forma semelhante, a proteína na parte aérea também foi significativamente afetada, com maiores valores em D2 (25,95%), diferindo de D0 (15,59%) e D1 (16,90%), que não diferiram entre si (Fig. 8B).

Aos 240 DAP, o teor de proteína na raiz não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, com médias de 5,64% (D0), 6,30% (D1) e 6,12% (D2) (Fig. 8C). Para a parte aérea, foram observadas diferenças significativas, com maior valor em D2 (25,68%), diferindo de D0 (22,38%), enquanto D1 (25,10%) apresentou comportamento intermediário (Fig. 8D).



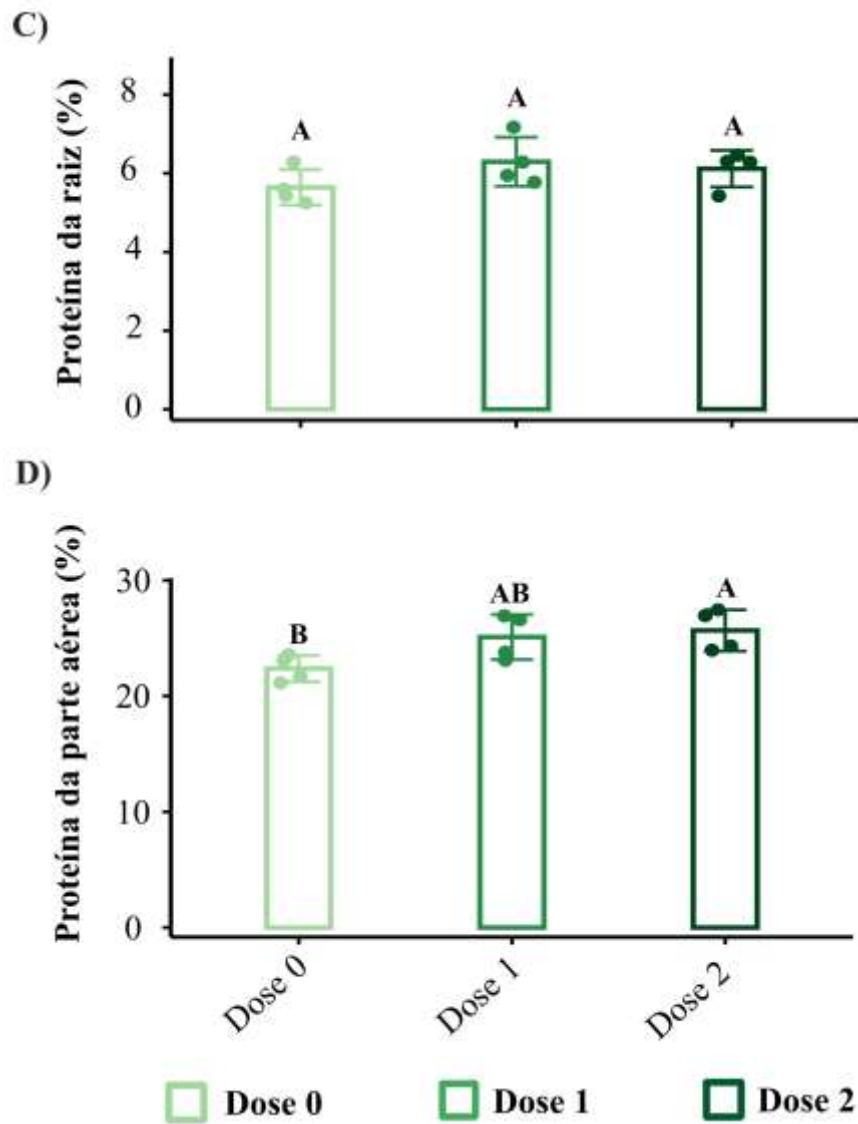


Figura 8. Teor de proteína na raiz (A, C) e na parte aérea (B, D) de plantas de batata-doce aos 60 (A, B) e 240 dias após o plantio (DAP) (C, D) sob diferentes doses de nitrogênio. As barras representam a média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Avaliações Moleculares

Análise transcricional em raízes tuberosas (45 DAP)

Aos 45 dias após o plantio (DAP), a expressão dos genes envolvidos na biossíntese de amido foi significativamente influenciada pelo suprimento nitrogenado. Para fins de organização dos resultados, os genes foram agrupados de acordo com sua posição na via metabólica em dois conjuntos: (i) genes associados ao fornecimento de carbono e ao controle do fluxo metabólico (etapas iniciais), incluindo

IbSUS, *IbAGPase* e *IbAATP*, e (ii) genes relacionados à síntese e à organização estrutural do amido (etapas finais), como *IbGBSSI*, *IbSSII*, *IbSBEI* e *IbISAI*.

Genes associados ao fornecimento de carbono e ao controle do fluxo metabólico (etapas iniciais)

A expressão relativa dos genes associados ao fornecimento de carbono e ao controle do fluxo metabólico (*IbSUS*, *IbAGPase* e *IbAATP*) foi significativamente influenciada pelas doses de nitrogênio e pelos tempos de avaliação (Fig. 9A–C).

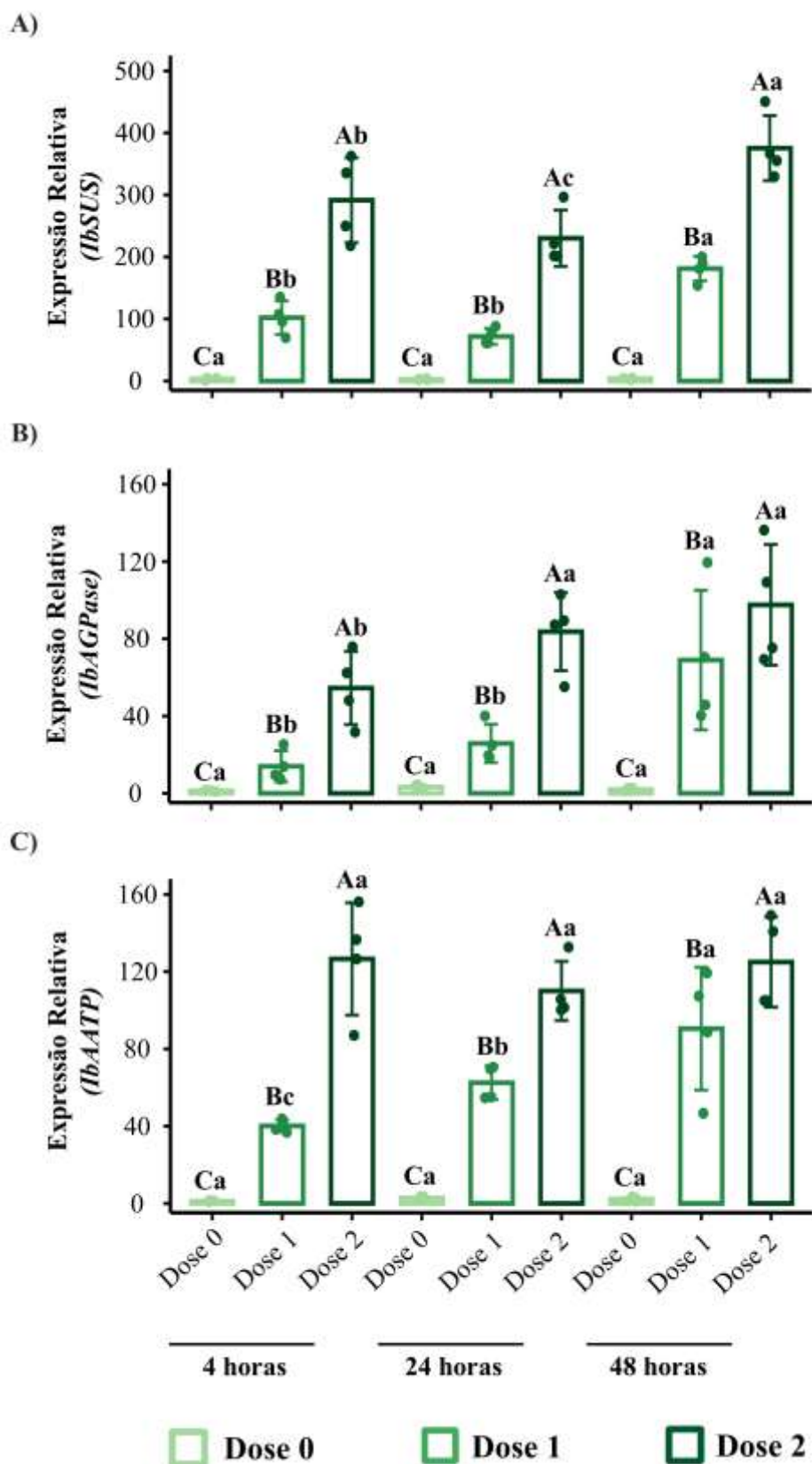


Figura 9. Expressão relativa dos genes associados ao fornecimento de carbono e ao controle do fluxo metabólico *IbSUS* (A), *IbAGPase* (B) e *IbAATP* (C) em raízes de batata-doce aos 45 dias após o plantio (DAP), em resposta às doses de nitrogênio (D0, D1 e D2) nos tempos de 4, 24 e 48 h. As barras representam a média \pm desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre doses

dentro de cada tempo, enquanto letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tempos dentro de cada dose, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Para o gene *IbSUS*, observou-se aumento consistente dos níveis de expressão com o incremento das doses de nitrogênio em todos os tempos avaliados. Em 4 h, a expressão relativa foi de 3,52 (D0), 102,14 (D1) e 291,54 (D2), com D2 superior às demais doses. Padrão semelhante foi observado em 24 h, com expressão de 2,77 (D0), 71,94 (D1) e 230,21 (D2). Em 48 h, os maiores níveis de expressão foram registrados, atingindo 3,88 (D0), 181,28 (D1) e 375,47 (D2). Ao longo do tempo, a expressão manteve-se estável em D0, enquanto nas doses D1 e D2 houve incremento progressivo, com maior expressão em 48 h (Fig. 9A).

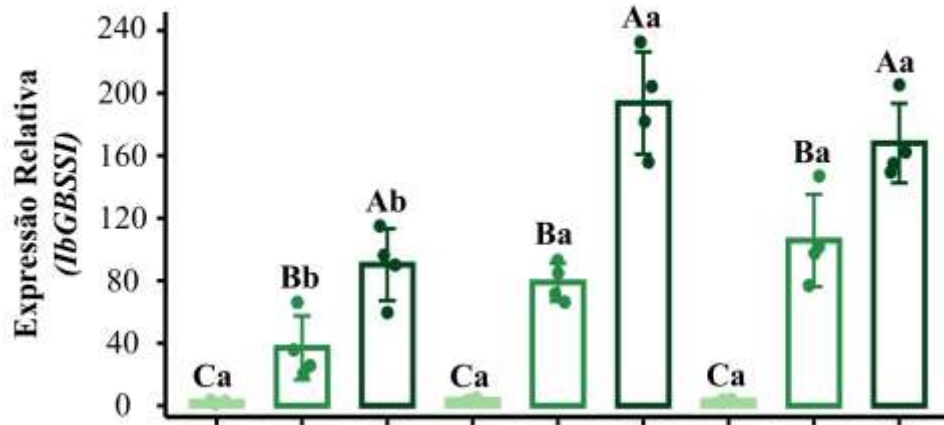
Para o gene *IbAGPase*, também foi observado aumento da expressão em resposta ao incremento das doses de nitrogênio. Em 4 h, a expressão relativa foi de 1,29 (D0), 13,99 (D1) e 54,52 (D2). Em 24 h, os níveis de expressão corresponderam a de 3,21 (D0), 25,82 (D1) e 83,69 (D2), enquanto em 48 h foram registrados 1,95 (D0), 69,01 (D1) e 97,56 (D2). A variação temporal foi mais evidente nas doses D1 e D2, com maiores níveis de expressão observados em 48 h (Fig. 9B).

Para o gene *IbAATP*, verificou-se aumento acentuado da expressão gênica com o incremento das doses de nitrogênio. Em 4 h, a expressão relativa foi de 1,25 (D0), 40,16 (D1) e 126,59 (D2). Em 24 h, os níveis de expressão foram de 2,78 (D0), 62,49 (D1) e 110,03 (D2). Em 48 h, registraram-se valores de expressão de 2,33 (D0), 90,53 (D1) e 124,98 (D2). Em relação ao tempo, a expressão manteve-se estável em D0, enquanto nas doses D1 e D2 houve incremento progressivo, com maior expressão observada em 48 h (Fig. 9C).

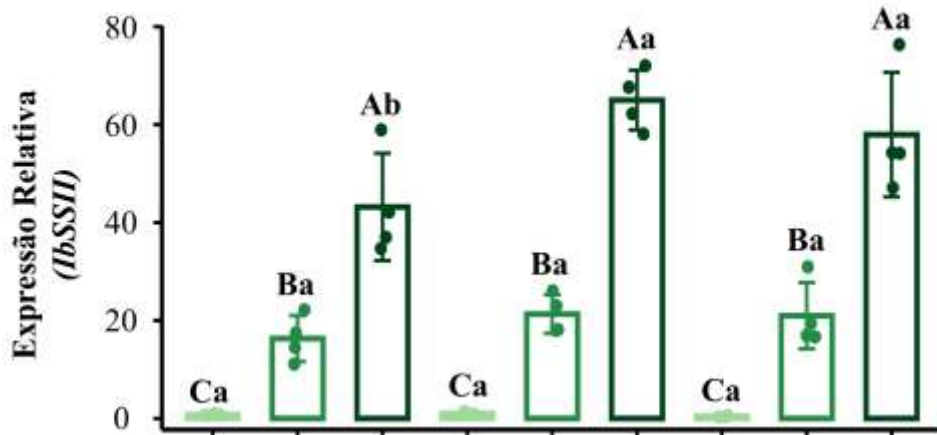
Genes relacionados à síntese e à organização estrutural do amido (etapas finais)

A expressão relativa dos genes relacionados à síntese e à organização estrutural do amido (*IbGBSSI*, *IbSSII*, *IbSBEI* e *IbISA1*) foi significativamente influenciada pelas doses de nitrogênio e pelos tempos de avaliação (Fig. 10A–D).

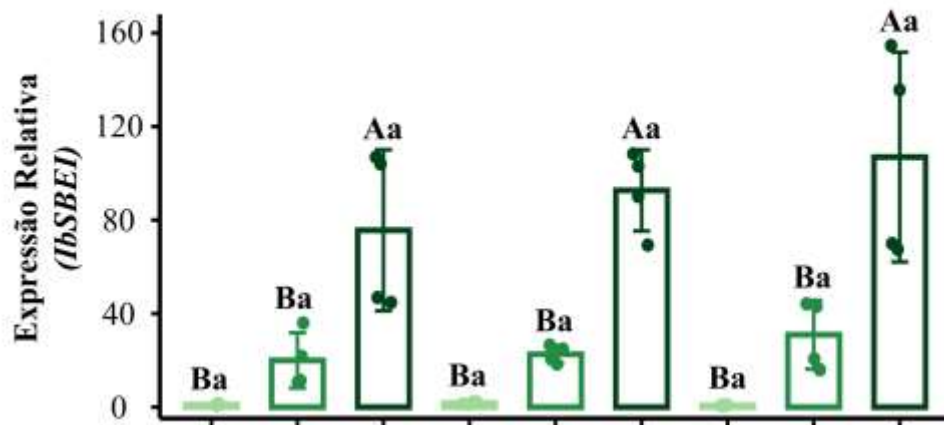
A)



B)



C)



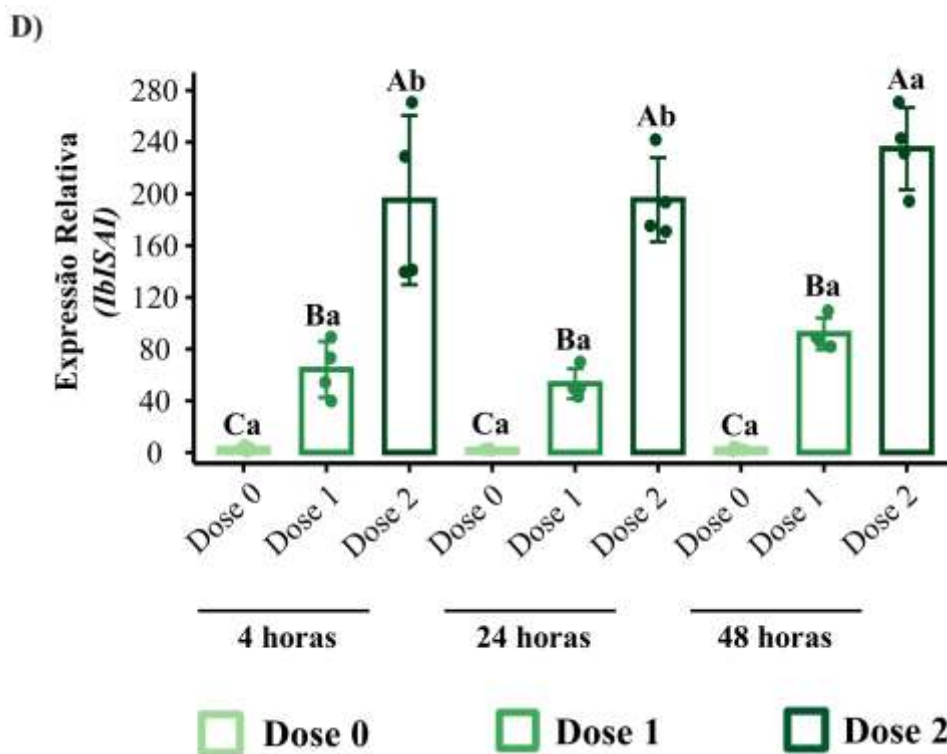


Figura 10. Expressão relativa dos genes estruturais da biossíntese de amido *IbGBSSI* (A), *IbSSII* (B), *IbSBEI* (C) e *IbISAI* (D) em raízes de batata-doce aos 45 dias após o plantio (DAP), em resposta às doses de nitrogênio (D0, D1 e D2) nos tempos de 4, 24 e 48 h. As barras representam a média \pm desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre doses dentro de cada tempo, enquanto letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre tempos dentro de cada dose, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Para o gene *IbGBSSI*, observou-se aumento dos níveis de expressão com o incremento das doses de nitrogênio em todos os tempos avaliados. Em 4 h, a expressão relativa foi de 2,65 (D0), 37,05 (D1) e 90,26 (D2). Em 24 h, os níveis de expressão foram de 3,87 (D0), 78,97 (D1) e 193,66 (D2), enquanto em 48 h corresponderam a 3,35 (D0), 105,76 (D1) e 168,01 (D2). Ao logo do tempo, a expressão manteve-se estável em D0, enquanto nas doses D1 e D2 foram observados maiores níveis de expressão em 24 e 48 h (Fig. 10A).

Para o gene *IbSSII*, a expressão gênica também aumentou com o incremento das doses de nitrogênio. Em 4 h, a expressão relativa foi de 0,78 (D0), 16,32 (D1) e 43,19 (D2). Em 24 h, os níveis de expressão corresponderam a 1,05 (D0), 21,31 (D1) e 65,01 (D2), enquanto em 48 h foram registrados de 0,46 (D0), 20,99 (D1) e 57,97 (D2). A variação temporal foi mais evidente nas doses D1 e D2, com maiores níveis de expressão observados em 24 e 48 h (Fig. 10B).

Para o gene *IbSBEI*, observou-se aumento da expressão principalmente na maior dose de nitrogênio. Em 4 h, a expressão relativa foi de 1,10 (D0), 19,99 (D1) e 75,65 (D2). Em 24 h, os níveis de expressão foram de 1,77 (D0), 22,61 (D1) e 92,70 (D2), enquanto em 48 h corresponderam de 0,82 (D0), 30,97 (D1) e 106,95 (D2). Não foram observadas variações temporais expressivas da expressão dentro de cada dose (Fig. 10C).

Para o gene *IbSAI*, a expressão aumentou com o incremento das doses de nitrogênio em todos os tempos avaliados. Em 4 h, a expressão relativa foi de 3,14 (D0), 64,17 (D1) e 195,18 (D2). Em 24 h, os níveis de expressão corresponderam a 2,47 (D0), 53,15 (D1) e 195,49 (D2), enquanto em 48 h foram registrados 2,80 (D0), 91,83 (D1) e 234,96 (D2). Em relação ao tempo, a expressão manteve-se estável em D0 e D1, enquanto na dose D2 foram observados maiores níveis de expressão em 48 h (Fig. 10D).

Discussão

Avaliações Agronômicas e Bioquímicas

Massa Seca da Raiz e Parte aérea (30, 60 e 240)

A ausência de diferenças significativas na massa seca da raiz e da parte aérea aos 30 DAP indica que a cultura se encontra em fase inicial de estabelecimento, com priorização do crescimento vegetativo. Nesse estágio, os recursos são direcionados para a expansão foliar e consolidação da capacidade fotossintética, em concordância com Chiewchankaset et al., (2022), que descrevem o predomínio do crescimento da parte aérea antes da formação de órgãos de reserva. Esses resultados também corroboram os achados Plunkert et al., (2024), ao indicar que, embora o nitrogênio já atue na regulação fisiológica, seus efeitos ainda não se refletem em acúmulo mensurável de biomassa.

Aos 60 DAP, a redução da massa seca radicular na maior dose de nitrogênio (D2) (12,50 g) em relação ao controle (22,50 g) evidencia alteração na relação fonte–dreno. Esse padrão confirma os resultados de Yao et al., (2020), que relatam inibição do crescimento radicular sob altas doses de N em fases iniciais da cultura. De forma complementar, os resultados são consistentes com os achados de Farhan et al., (2024), sugerindo que o excesso de N favorece o crescimento da parte aérea, como

observado pelo maior acúmulo de biomassa aérea, reduzindo a alocação de assimilados para as raízes de reserva.

Aos 240 DAP, observa-se uma inversão desse padrão, com maior biomassa radicular e maior relação raiz/parte aérea na dose D2. Esse comportamento está alinhado às observações de Ahmad et al., (2026), segundo os quais o nitrogênio modula a força dos drenos ao longo do ciclo da cultura. No entanto, os resultados deste estudo ampliam essa interpretação ao indicar que, em ciclos mais longos, o maior crescimento vegetativo inicial pode atuar como fonte sustentada de assimilados, favorecendo o acúmulo tardio de biomassa nas raízes. Dessa maneira, semelhante, (Varga et al., 2025), associam o suprimento de nitrogênio à manutenção da atividade foliar e ao prolongamento da fase de enchimento, resultando em maior acúmulo final de biomassa.

Produtividade, teor de amido e estimativa de etanol (240DAP)

Aos 240 DAP, a dose D2 proporcionou a maior produtividade de raízes (55,41 t ha⁻¹), superando significativamente o controle (D0) e evidenciando a elevada capacidade da cultura em converter a disponibilidade nutricional em biomassa final. Esse resultado reforça as observações de Lemma et al., (2023), que destacam a manutenção de elevada demanda nutricional desde o início do enchimento das raízes tuberosas até o final do ciclo. De forma semelhante, a produtividade da parte aérea atingiu 106,25 t ha⁻¹ em D2, em concordância com Shu et al., (2024) que relacionam o aumento da disponibilidade de nitrogênio à maior capacidade fotossintética e ao incremento do índice SPAD (indicador indireto do teor de clorofila foliar), fatores essenciais para sustentar o crescimento em ciclos prolongados.

A elevada resposta produtiva ao final do ciclo está associada à maior eficiência na alocação de fotoassimilados para as raízes de reserva. O fato de a máxima produtividade ocorrer em colheita tardia reforça a interpretação de Dong et al., (2022), de que a demanda por nitrogênio é mais elevada durante a fase de crescimento das raízes do que na fase de iniciação. Além disso, o alto rendimento observado em D2 sugere que o nitrogênio também atua na regulação de processos estruturais, uma vez que seu fornecimento adequado pode retardar a lignificação radicular, prolongando a atividade cambial e permitindo a expansão contínua das células de reserva até os 240 DAP, conforme descrito por Meng; Wang; Si, (2022).

Durante a condução do experimento, observou-se infestação de herbívoros popularmente conhecidos como “vaquinha”, com predominância de *Diabrotica*

speciosa, associada à desfolha foliar em plantas de batata-doce. Embora a intensidade do ataque não tenha sido monitorada quantitativamente entre os tratamentos, a literatura demonstra que a maior disponibilidade de nitrogênio (N) pode elevar a atratividade e a qualidade nutricional dos tecidos vegetais para insetos mastigadores (Carneiro et al., 2022). Nesse contexto, a redução do teor de amido em D1 (23,54%) e sua subsequente recuperação em D2 (28,34%) sugerem que níveis intermediários de N podem ter acentuado o desequilíbrio metabólico entre crescimento, defesa e partição de reservas. Adicionalmente, *D. speciosa* pode reduzir a área fotossintética por desfolha e comprometer tecidos radiculares, limitando o aporte de fotoassimilados para os órgãos de reserva (Cabral; Haseeb; Soares, 2024; Costa et al., 2022). O incremento da proteína radicular em D1 (5,29%) reforça a hipótese de maior demanda metabólica associada à manutenção celular e respostas adaptativas à herbivoria, em detrimento da síntese de amido. Tal comportamento diverge parcialmente de Du et al., (2020), que, ao aplicarem a dose de manejo convencional (CM: 100 kg N ha⁻¹), considerada excessiva em seu sistema por reduzir a taxa de acúmulo, relataram queda no rendimento de amido. No entanto, os resultados convergem parcialmente com Shu et al., (2024), que, em seu nível mais elevado de adubação (N4: 240 kg N ha⁻¹), observaram incrementos contínuos nos teores de amido e proteína nos tubérculos, indicando que o aumento da biomassa foliar pode otimizar o fornecimento de assimilados às raízes tuberosas mesmo sob alta disponibilidade de nitrogênio.

Como consequência, a estimativa de produção de etanol em D2 (11.159 L ha⁻¹) foi significativamente superior, mais que duplicando os valores observados nas demais doses. Esse resultado reforça o potencial da batata-doce como matéria-prima estratégica para a bioeconomia (Zhang et al., 2025), evidenciando que a elevada eficiência na conversão do amido em substratos fermentáveis constitui um fator determinante para a expansão de sistemas produtivos voltados à produção sustentável de bioenergia.

Proteína da raiz e parte aérea (60 e 240 DAP)

Aos 60 DAP, a maior dose de nitrogênio (D2) elevou significativamente o teor de proteína na raiz (11,22%) e na parte aérea (25,95%), corroborando Mahboob; Yang; Irfan, (2023), que destacam o papel do N na síntese proteica e na sustentação da capacidade fotossintética inicial. O maior acúmulo de proteína na parte aérea indica maior alocação de recursos para o crescimento vegetativo e evidencia, de forma

integrada, um redirecionamento do metabolismo do carbono sob alta disponibilidade de N. Neste sentido, (Drapal; Gerrish; Fraser, 2022; Lal et al., 2022), relatam que a intensificação da síntese de compostos nitrogenados ocorre em detrimento do acúmulo de reservas, refletindo a regulação da partição carbono–nitrogênio em fases de crescimento ativo.

Aos 240 DAP, o teor de proteína nas raízes não diferiu entre as doses, apesar do aumento da biomassa, o que está parcialmente com o efeito de diluição descrito por Lal et al., (2022). Os resultados do presente estudo ampliam essa interpretação ao indicar que, em batata-doce, a redução relativa da proteína está associada à intensificação do dreno metabólico para síntese e acúmulo de amido, como também sugerido por Pan et al., (2026b). Em contraste, a manutenção de maiores teores de proteína na parte aérea em D2 até o final do ciclo corrobora os achados de (Duan et al., 2024; Fathi, 2022), indicando retardamento da senescência e prolongamento da atividade fotossintética. Adicionalmente, os dados aqui apresentados sugerem que a manutenção da parte aérea atua como fonte sustentada de assimilados, favorecendo o acúmulo de reservas nas raízes tuberosas sem comprometer seu desenvolvimento..

De forma integrada, os resultados evidenciam que o nitrogênio regula dinamicamente a partição de carbono ao longo do ciclo, estimulando a síntese proteica em estágios iniciais e favorecendo o acúmulo de reservas em fases tardias. Esse padrão corrobora os modelos clássicos de relação fonte–dreno e reforça que a manutenção da atividade da parte aérea sob maior disponibilidade de N é determinante para sustentar o processo de tuberização das raízes de reserva.

Avaliações Moleculares

Análise transcricional em raízes tuberosas (45 DAP)

Genes associados ao fornecimento de carbono e ao controle do fluxo metabólico (etapas iniciais)

A resposta transcricional observada nas primeiras 48 horas após a adubação nitrogenada aos 45 DAP evidencia que o nitrogênio atua como um regulador-chave e imediato do metabolismo de carbono em batata-doce, promovendo aumento expressivo e dose-dependente na expressão de IbSUS, IbAGPase e IbAATP. Esse padrão corrobora modelos atuais que posicionam a sucrose synthase como um importante determinante da força de dreno, ao intensificar a clivagem da sacarose e

o fornecimento de precursores para a biossíntese de amido (Cai et al., 2022; Jiang et al., 2024), bem como o papel da AGPase como enzima limitante diretamente associada ao acúmulo de amido e à produtividade (Abdulsalami; Lim; Cho, 2024; Pan et al., 2026a).

Entretanto, os resultados divergem parcialmente dos reportados por Han et al., (2024), que observaram repressão transcricional desses genes sob excesso de nitrogênio em estágios de desenvolvimento radicular, indicando que o efeito do N é fortemente dependente do estágio fisiológico. Nesse contexto, o presente estudo amplia a literatura ao evidenciar uma fase precoce de ativação transcricional positiva, na qual o nitrogênio atua como indutor da capacidade metabólica e do fortalecimento do dreno.

Adicionalmente, a forte indução de *IbAATP*, em associação com *IbSUS* e *IbAGPase*, expande os achados de Wang et al., (2016), que demonstraram que o nitrogênio não apenas estimula o fornecimento de carbono, mas também coordena o suporte energético plastidial necessário à síntese de amido. Essa ativação simultânea desses genes sugere um mecanismo integrado de coordenação entre suprimento energético e fluxo de carbono, no qual a oferta de substratos e energia ocorre de forma coordenada, aspecto pouco explorado em estudos anteriores.

Em contraste com condições de estresse, nas quais genes-chave da via da biossíntese de amido frequentemente apresentam repressão transcricional (Sheng et al., 2023), os resultados indicam o estabelecimento de uma resposta transcricional positiva ao longo do período avaliado sob disponibilidade adequada de N. Dessa forma, o presente estudo não apenas corrobora o conhecimento estabelecido sobre a regulação da biossíntese de amido, mas também demonstra que o nitrogênio coordena, de forma integrada e hierárquica, os componentes das etapas iniciais da via metabólica, estabelecendo as bases para a intensificação da força de dreno e da eficiência metabólica em raízes tuberosas.

Genes relacionados à síntese e à organização estrutural do amido (etapas finais)

A ativação dos genes *IbGBSSI*, *IbSSII*, *IbSBEI* e *IbISAI* nas primeiras 48 horas após a adubação nitrogenada sugere que a disponibilidade de N influencia as etapas finais da biossíntese e da organização estrutural do amido em raízes tuberosas, favorecendo a conversão do fluxo metabólico previamente estabelecido em polímeros estruturalmente organizados. O aumento significativo na expressão de *IbGBSSI* e *IbSSII* com o incremento das doses de N está de acordo com estudos que associam

a *IbGBSSI* à síntese de amilose e as *starch synthases* ao processo de alongação das cadeias de amilopectina (Cai et al., 2022; Kitahara et al., 2017; Otani et al., 2007).

A indução expressiva de *IbSBEI*, principalmente sob a maior dose de N (D2) amplia os achados previamente reportados por Song et al, (2022), sugerindo que a formação de ramificações pode depender de um limiar mínimo de disponibilidade de N e de fluxo de carbono metabolicamente ativo. De forma complementar, o aumento de *IbISA1* corrobora estudos que destacam o papel da isoamilase na organização, maturação e cristalização do grânulos de amido (Lai et al., 2016; Wang et al., 2022), indicando que a disponibilidade de N pode influenciar não apenas a síntese polímero, mas também a organização estrutural.

Entretanto, observa-se um contraste relevante com o modelo de supressão metabólica proposto por Han et al., (2024). Enquanto esses autores relatam que o excesso de nitrogênio compromete a biossíntese de amido em raízes tuberosas, nossos resultados indicam que, aos 45 DAP, as etapas finais via biossintética permanecem metabolicamente responsivas, com a dose mais elevada (D2) promovendo a maior expressão dos genes estruturais. Esse padrão sugere que, nesse estágio fisiológico, a disponibilidade de N ainda atua de forma positiva sobre a formação do polímero, precedendo possíveis efeitos limitantes descritos em fases posteriores do desenvolvimento.

Em contraste com condições de estresse, como a deficiência hídrica, que reduzem a expressão desses genes e comprometem a formação do grânulo (Sheng et al., 2023), os resultados aqui obtidos demonstram uma resposta coordenada e sustentada, caracterizada pela ativação simultânea de enzimas de síntese, ramificação e remodelamento.

Dessa forma integrada, os achados do presente estudo sustentam a hipótese de que a disponibilidade precoce de N promove uma regulação integrada coordenada das etapas finais da via de biossíntese de amido, favorecendo simultaneamente a quantidade e a organização estrutural do amido em resposta à disponibilidade nutricional.

Relação entre ativação transcricional precoce e desempenho produtivo ao final do ciclo

A ativação transcricional observada aos 45 DAP apresenta forte coerência fisiológica com os resultados agrônômicos e bioquímicos obtidos ao final do ciclo, sugerindo que as respostas moleculares induzidas precocemente pela disponibilidade

de N podem ter contribuído diretamente para o maior desempenho produtivo observado em D2 aos 240 DAP. A indução simultânea de genes associados ao fornecimento de carbono (*IbSUS*, *IbAGPase* e *IbAATP*) e de genes relacionados às etapas finais da biossíntese de amido (*IbGBSSI*, *IbSSII*, *IbSBEI* e *IbISAI*) indica o estabelecimento precoce de um metabolismo orientado ao fortalecimento da força de dreno e ao acúmulo eficiente de reservas.

Essa resposta coordenada está em concordância com o maior acúmulo de biomassa radicular (27,81 t ha⁻¹), maior produtividade de raízes (55,42 t ha⁻¹) e manutenção de elevados teores de amido (28,34%) observados sob a maior dose de N ao final do ciclo. De forma adicional, o maior rendimento estimado de etanol (11.159 L ha⁻¹) reforça que a ativação precoce da maquinaria molecular relacionada à biossíntese e organização estrutural do amido pode ter repercussões diretas sobre o potencial industrial da cultura.

Embora a abundância transcricional, isoladamente, não reflita necessariamente a atividade enzimática, o acúmulo efetivo de amido ou a dinâmica real da partição de carbono nos tecidos em desenvolvimento, a forte associação temporal entre a ativação molecular precoce e o desempenho agrônômico observado ao final do ciclo sustenta a hipótese de que o nitrogênio atua como um sinal metabólico capaz de modular, de forma integrada, eventos moleculares e fisiológicos determinantes para a produtividade e o potencial bioenergético das raízes tuberosas de batata-doce.

Conclusão

De forma integrada, os resultados indicam que a ativação molecular precoce induzida pelo N contribui para o estabelecimento de um sistema fonte–dreno mais eficiente e sustentado ao longo do ciclo da cultura. A forte associação entre a resposta transcricional observada aos 45 DAP e o maior desempenho agrônômico e bioenergético ao final do ciclo sugere que o nitrogênio atua como um importante modulador metabólico do acúmulo de reservas carbonadas em raízes tuberosas de batata-doce.

Além disso, este estudo apresenta evidências inéditas sobre a dinâmica transcricional precoce de genes relacionados ao fornecimento de carbono, suporte energético e biossíntese de amido em raízes tuberosas submetidas à adubação nitrogenada, considerando respostas em 4, 24 e 48 h após aplicações sucessivas de N ao longo da fase inicial de desenvolvimento da cultura. Assim, a elevada

plasticidade fisiológica observada na cultivar 'Duda' reforça o potencial da cultura como matéria-prima estratégica para sistemas de produção voltados à bioenergia sob adequado manejo nitrogenado. Entretanto, estudos futuros envolvendo diferentes genótipos e condições ambientais serão importantes para validar a estabilidade dessas respostas sob distintas interações genótipo x ambiente.

Referências

ABDULSALAMI, Haruna Anate; LIM, Yookyung; CHO, Hyunwoo. **Genetic elements controlling starch biosynthesis and secondary growth in root and tuber crops.** Journal of Plant Biotechnology Korean Society of Plant Biotechnology, , 1 jan. 2024.

AHMAD, Rafiq *et al.* **Optimizing Nitrogen and Planting Density Improves Source-Sink Balance, Nutrient Efficiency, Yield, and Economic Returns in Sweet Potato.** 6 abr. 2026. Disponível em: <<https://www.researchsquare.com/article/rs-9197486/v1>>

ALTSCHUL, Stephen F. *et al.* **Basic local alignment search tool.** Journal of Molecular Biology, v. 215, n. 3, p. 403–410, 5 out. 1990.

ALVES, Marco Antônio Baleeiro; LIMA, Araken Alves de;; PÔRTO JUNIOR, Francisco Gilson Rebouças. **Temas estratégicos e o processo de inovação.** [S.l.: S.n.].

BREMNER, J. M. **Determination of nitrogen in soil by the Kjeldahl method.** The Journal of Agricultural Science, v. 55, n. 1, p. 11–33, 1960.

BUSTIN, Stephen A. *et al.* **The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.** Clinical Chemistry, v. 55, n. 4, p. 611–622, 1 abr. 2009.

BUSTIN, Stephen A. *et al.* **MIQE 2.0: Revision of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments Guidelines.** Clinical Chemistry, v. 71, n. 6, p. 634–651, 3 jun. 2025.

CABRAL, Maria J. S.; HASEEB, Muhammad; SOARES, Marcus A. **Major Insect Pests of Sweet Potatoes in Brazil and the United States, with Information on Crop Production and Regulatory Pest Management.** Insects Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 out. 2024.

CAI, Zhaoqin *et al.* **Transcriptomic analysis of tuberous root in two sweet potato varieties reveals the important genes and regulatory pathways in tuberous root development.** BMC Genomics, v. 23, n. 1, 1 dez. 2022.

CARNEIRO, Eliane *et al.* **Morphogenetic analysis of common bean genotypes in response to *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Arthropod-Plant Interactions*, v. 16, n. 5, p. 477–493, 1 out. 2022.**

CHIEWCHANKASET, Porntip *et al.* **Effective Metabolic Carbon Utilization and Shoot-to-Root Partitioning Modulate Distinctive Yield in High Yielding Cassava Variety.** *Frontiers in Plant Science*, v. 13, 16 fev. 2022.

COSTA, Eduardo Neves *et al.* **Above- and belowground resistance in Brazilian maize varieties under attack of *Spodoptera frugiperda* and *Diabrotica speciosa*.** *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v. 170, n. 8, p. 718–726, 1 ago. 2022.

DE OLIVEIRA, Gabriel Duarte *et al.* **Evaluation of cleaning methods and viral indexing in sweet potato genotypes.** *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, v. 61, n. 1, p. 219–228, 1 fev. 2025.

DE SOUZA, Micaele Rodrigues *et al.* **RGeasy: a reference gene analysis tool for gene expression studies via RT-qPCR.** *BMC Genomics*, v. 25, n. 1, p. 907, 30 set. 2024.

DONG, Hong Tham *et al.* **Optimum Nitrogen Application Promotes Sweetpotato Storage Root Initiation.** *Horticulturae*, v. 8, n. 8, 1 ago. 2022.

DRAPAL, Margit; GERRISH, Christopher; FRASER, Paul D. **Changes in carbon allocation and subplastidal amyloplast structures of specialised *Ipomoea batatas* (sweet potato) storage root phenotypes.** *Phytochemistry*, v. 203, 1 nov. 2022.

DUAN, Wenxue *et al.* **Nitrogen utilization characteristics and early storage root development in nitrogen-tolerant and nitrogen-susceptible sweet potato.** *Physiologia Plantarum*, v. 173, n. 3, p. 1090–1104, 1 nov. 2021.

DUAN, Wenxue *et al.* **Plant growth and nitrate absorption and assimilation of two sweet potato cultivars with different N tolerances in response to nitrate supply.** *Scientific Reports*, v. 14, n. 1, 1 dez. 2024.

EMBRAPA. **Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na.** 2017.

EMBRAPA HORTALIÇAS. **Batata-doce Sistema de Produção de Batata-Doce.** Brasília/DF: EMBRAPA, 2023.

FAN, Weijuan *et al.* **Sweet potato ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit affects vegetative growth, starch content and storage root yield.** *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 200, 1 jul. 2023.

FARHAN, Muhammad *et al.* **Plant Nitrogen Metabolism: Balancing Resilience to Nutritional Stress and Abiotic Challenges.** *Phyton-International Journal of Experimental Botany Tech Science Press*, , 2024.

- FATHI, Amin. **Role of nitrogen (N) in plant growth, photosynthesis pigments, and N use efficiency: A review.** e3917 Agrisost |, v. 28, p. 1–8, 2022.
- FERREIRA, Daniel Furtado. **Sisvar: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs.** Revista Brasileira de Biometria, v. 37, n. 4, p. 529–535, 20 dez. 2019.
- GONÇALVES, R. C. *et al.* **Evaluation of extraction methods for obtaining high-quality RNA from sweet potato.** Genetics and Molecular Research, v. 20, n. 4, 2021.
- HAN, Shaoxuan *et al.* **Genome-Wide Identification and Analysis of SUS and AGPase Family Members in Sweet Potato: Response to Excessive Nitrogen Stress during Storage Root Formation.** International Journal of Molecular Sciences, v. 25, n. 15, 1 ago. 2024.
- HE, Shutao *et al.* **Dynamic network biomarker analysis discovers IbNAC083 in the initiation and regulation of sweet potato root tuberization.** Plant Journal, v. 108, n. 3, p. 793–813, 1 nov. 2021.
- JIANG, Zhicheng *et al.* **Source-sink synergy is the key unlocking sweet potato starch yield potential.** Nature Communications, v. 15, n. 1, 1 dez. 2024.
- KITAHARA, Kanefumi *et al.* **Carbohydrate components in sweetpotato storage roots: Their diversities and genetic improvement.** Breeding Science Japanese Society of Breeding, , 2017.
- LAI, Yung C. *et al.* **Physicochemical properties of starches and expression and activity of starch biosynthesis-related genes in sweet potatoes.** Food Chemistry, v. 199, p. 556–564, 15 maio 2016.
- LAL, Milan Kumar *et al.* **From source to sink: mechanistic insight of photoassimilates synthesis and partitioning under high temperature and elevated [CO₂].** Plant Molecular Biology Springer Science and Business Media B.V., , 1 nov. 2022.
- LEMMA, Miheret Hendebo *et al.* **Nutrient Uptake and Efficiencies of Orange-Fleshed Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.) Varieties under Different Rates of Nitrogen and Phosphorus Fertilizers.** International Journal of Agronomy, v. 2023.
- LYU, Ruiqing *et al.* **Engineering properties of sweet potato starch for industrial applications by biotechnological techniques including genome editing.** International Journal of Molecular Sciences MDPI, , 1 set. 2021.
- MAHBOOB, Wajid; YANG, Guozheng; IRFAN, Muhammad. **Crop nitrogen (N) utilization mechanism and strategies to improve N use efficiency.** Acta Physiologiae Plantarum Institute for Ionics, , 1 abr. 2023.

MELO ET AL., 2020. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento 205: Produção de batata-doce utilizando mudas produzidas em bandejas com diferentes volumes de célula e períodos de enraizamento.** 2020.

MENG, Ya Yi *et al.* **Genome-Wide Analysis of Sweet Potato Ammonium Transporter (AMT): Influence on Nitrogen Utilization, Storage Root Development and Yield.** International Journal of Molecular Sciences, v. 24, n. 24, 1 dez. 2023.

MENG, Ya Yi; WANG, Ning; SI, Cheng. **The Application of Nitrogen Source in Regulating Lignin Biosynthesis, Storage Root Development and Yield of Sweet Potato.** Agronomy, v. 12, n. 10, 1 out. 2022.

MOMENTÉ, Valéria Gomes *et al.* Avaliação de genótipos de batata-doce com potencial para produção de etanol. **Observatório de la economía latinoamericana**, v. 23, n. 1, p. e8843, 31 jan. 2025.

MORAES, Melissa Barbosa Fonseca *et al.* **Evaluation and validation of reference genes for RT-qPCR normalization in different sweet potato tissues.** Scientific Reports, v. 15, n. 1, 1 dez. 2025.

OTANI, Motoyasu *et al.* **Inhibition of the gene expression for granule-bound starch synthase I by RNA interference in sweet potato plants.** Plant Cell Reports, v. 26, n. 10, p. 1801–1807, out. 2007.

PAN, Heyan *et al.* **Reducing nitrogen with dense planting increase sweetpotato storage roots quantity via favoring starch synthesis over lignification.** iScience, v. 29, n. 3, p. 114969, mar. 2026.

PENG, Kui *et al.* **Genome-Wide Identification and Expression Analysis of the NLP Family in Sweet Potato and Its Two Diploid Relatives.** International Journal of Molecular Sciences, v. 26, n. 17, 1 set. 2025.

PFAFFL, Michael W. **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR Nucleic Acids Research.** 2001.

PLUNKERT, Madison L. *et al.* **Tuber, or not tuber: Molecular and morphological basis of underground storage organ development.** 2024. Disponível em: <<https://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/>>.

POSIT TEAM. **RStudio: Integrated Development Environment for R.** Boston, MA Posit Software, PBC, , 2025. Disponível em: <<https://posit.co/>>. Acesso em: 18 maio. 2026

SHENG, Minfei *et al.* **Long-Term Soil Drought Limits Starch Accumulation by Altering Sucrose Transport and Starch Synthesis in Sweet Potato Tuberos Root.** International Journal of Molecular Sciences, v. 24, n. 3, 1 fev. 2023.

SHU, Xing *et al.* **The Effect of Nitrogen and Potassium Interaction on the Leaf Physiological Characteristics, Yield, and Quality of Sweet Potato.** *Agronomy*, v. 14, n. 10, 1 out. 2024.

SILVA, et al. **Concentração de amido e estimativa de rendimento de álcool em batata-doce cultivada com diferentes fontes e doses de potássio.** 2013.

SILVEIRA et al. **BOLETIM TÉCNICO UFT: A Cultura da batata-doce como fonte de matéria prima para produção de etanol.** Palmas: 2014.

SILVEIRA, Márcio Antônio da; *et al.* **A Cultura da batata-doce como fonte de matéria prima para produção de etanol.** Palmas, TO: 2014.

SUN, Zongjian *et al.* **Genome-Wide Identification and Expression Analysis of the Starch Synthase Gene Family in Sweet Potato and Two of Its Closely Related Species.** *Genes*, v. 15, n. 4, 1 abr. 2024a.

SUN, Zongjian *et al.* **Genome-Wide Identification and Expression Analysis of the Starch Synthase Gene Family in Sweet Potato and Two of Its Closely Related Species.** *Genes*, v. 15, n. 4, 1 abr. 2024b.

WANG, Xin *et al.* **Evaluation of Physiological Coping Strategies and Quality Substances in Purple Sweet Potato under Different Salinity Levels.** *Genes*, v. 13, n. 8, 1 ago. 2022.

WANG, Yan nan *et al.* **A plastidic ATP/ADP transporter gene, IbAATP, increases starch and amylose contents and alters starch structure in transgenic sweetpotato.** *Journal of Integrative Agriculture*, v. 15, n. 9, p. 1968–1982, 2016.

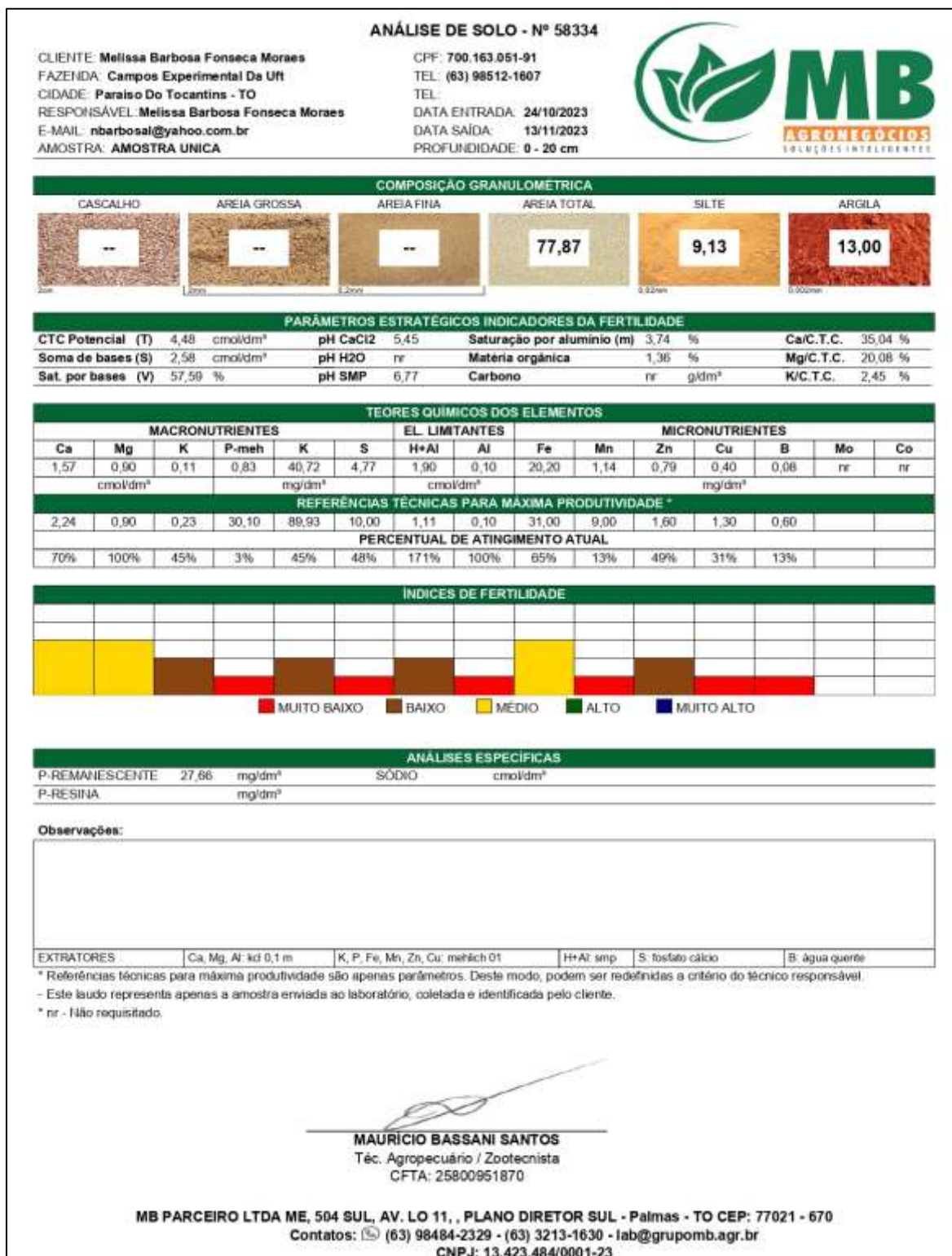
WICKHAM, Hadley. **GGPLOT2: Elegant Graphics for Data Analysis.** New York: Springer-Verlag, 2016.

YAO, Z. *et al.* **Involvement of nitrogen in storage root growth and related gene expression in sweet potato (*Ipomoea batatas*).** *Plant Biology*, v. 22, n. 3, p. 376–385, 1 maio 2020.

ZHANG, Jingzhen *et al.* **Transcriptome analysis reveals the impact of short-term biochar application on starch and sucrose metabolism in sweet potato tuberous roots.** *Industrial Crops and Products*, v. 223, 1 jan. 2025.

MATERIAL SUPLEMENTAR S1

Figura S1. Análise química e granulométrica do solo coletado na camada de 0–20 cm no Campos Experimental da UFT, em Palmas/TO, utilizado nos experimentos de campo e casa de vegetação. O solo foi classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico, apresentando textura arenosa, baixa matéria orgânica e baixos teores de fósforo e potássio.



MATERIAL SUPLEMENTAR S2

Figura S2. Protocolo de extração de RNA total a partir de raízes tuberosas de batata-doce utilizando método de fenol ácido a quente modificado, incluindo maceração em nitrogênio líquido, extração orgânica sequencial (fenol e clorofórmio), precipitação com isopropanol e purificação com etanol, conforme descrito no protocolo experimental.



PROTÓCOLO EXTRAÇÃO DE RNA MÉTOD0 DE FENOL ÁCIDO A QUENTE – MODIFICADO BATATA-DOCE (RAIZ TUBEROSA)

1. Macerar as amostras com nitrogênio líquido e adicionar 0,5 mL de tecido macerado em tubos de 2 mL.
2. Adicionar 850 µl de Fenol ácido (saturar ponteira), 750 µl de TES e 150 de β-mercaptanol e vórtex por 1 minuto.

Obs. Agitar bem o ácido fenol

3. Lacrar os tubos com parafilme e levar ao banho maria (65°) por 40 minutos. A cada 20 minutos, levar ao vórtex por 30 segundos.
4. Centrifugar por 10 min/14.000 rpm/4°C.
5. Transferir a fase superior (fase aquosa, 700 µl) para um novo microtubo de 1,5 mL, adicionar 700 µl de Fenol ácido (saturar ponteira) e vórtex por 1 minuto.
6. Centrifugar 10 min/14.000 rpm/4°C.
7. Transferir a fase superior (fase aquosa, 500 µl) para um novo microtubo de 1,5 mL.
8. Adicionar 500 µl de clorofórmio e vórtex por 30 segundos.
9. Centrifugar 10 min/14.000 rpm/4°C.
10. Transferir delicadamente a fase superior (fase aquosa, 300 µl) para um novo microtubo de 1,5 mL.

OBS.: Juntar no mesmo tubo duas amostras idênticas, totalizando um volume final de 600 µl. É essencial que isso seja feito antes da adição do isopropanol.

11. Adicionar 600 µl isopropanol, misturar por inversão 12 vezes.
12. Incubar por 40min à -20°C.
13. Centrifugar 30 min/14.000 rpm/4°C.
14. Descartar o sobrenadante e lavar o precipitado com 800 µl de etanol 75% e centrifugar 8 min/14.000 rpm/4°C.
15. Descartar o sobrenadante. Dar um spin (30seg/14.000 rpm/4°C) e retirar todo o excesso de álcool, tendo cuidado para não puxar o pellet.
16. Levar para a estufa (tubos abertos) por 7 min a 37°C.
17. Ressuspender em 20 µl de H₂O comercial.

- TES: 10 mM de Tris-HCl pH 7,5, 10 mM de EDTA e 0,5% SDS.