

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA DIGITAL

**ANÁLISE COMPARATIVA DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO VISANDO A
OBTENÇÃO DE RNA DE QUALIDADE NA CULTURA DA MANDIOCA**

PALMAS, TO

2025

GIZELA MARIA DE ARAÚJO SOUSA

**ANÁLISE COMPARATIVA DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO VISANDO A
OBTENÇÃO DE RNA DE QUALIDADE NA CULTURA DA MANDIOCA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agroenergia Digital da Universidade Federal do Tocantins como requisito à obtenção do título de Mestre em Agroenergia Digital.

Orientadora: Prof. Dra. Solange Aparecida Ságio.

Coorientador: Prof. Dr. Horllys Gomes Barreto

PALMAS, TO

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- S725a Sousa, Gizela maria de Araújo.
Análise comparativa de métodos de extração visando a obtenção de RNA de qualidade na cultura da mandioca.. / Gizela maria de Araújo Sousa. – Palmas, TO, 2025.
67 f.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Agroenergia, 2025.
Orientadora : Solange Aparecida Ságio
Coorientador: Horllys Gomes Barreto
1. Transcriptoma. 2. expressão gênica. 3. RT-qPCR. 4. Manihot esculenta. I. Título

CDD 333.7

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

GIZELA MARIA DE ARAÚJO SOUSA

**ANÁLISE COMPARATIVA DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO VISANDO A
OBTENÇÃO DE RNA DE QUALIDADE NA CULTURA DA MANDIOCA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Agroenergia Digital da Universidade Federal do Tocantins para
a obtenção do título de Mestre em Agroenergia.

Orientadora: Prof. Dra. Solange Aparecida Ságio.

Coorientador: Prof. Dr. Horllys Gomes Barreto.

Data da aprovação:
10/04/2025

Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
 ERICH COLLICCHIO
Data: 05/05/2025 12:40:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr Erich Collichio, Presidente da Banca, UFT



Dr. Carlos Henrique Cardon, Membro Externo, University of Georgia

Documento assinado digitalmente
 GUSTAVO AZEVEDO CAMPOS
Data: 03/05/2025 05:46:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Gustavo Azevedo Campos, Membro Externo, Embrapa

Dedico...

Esta jornada a DEUS, que guia meus passos, assim como tudo em minha vida, sem ELE nada seria possível e à minha família, que é a luz, força que me impulsiona.

AGRADECIMENTOS

Sou imensamente grata a DEUS, não apenas me propiciou oportunidades, mas cuidou para que todo o processo valesse a pena e, de alguma forma, contribuísse para o meu crescimento intelectual e espiritual.

Aos meus pais. Quero dedicar um momento para expressar minha profunda gratidão a vocês. Não há palavras suficientes para descrever o quanto sou grata por todo o amor, apoio e dedicação que sempre me deram. Desde as pequenas coisas até os grandes sacrifícios, cada gesto de carinho e cuidado foi fundamental para me tornar a pessoa que sou hoje.

Ao meu marido Marley expresso minha profunda gratidão a você. Obrigada por ser meu parceiro, meu amigo e meu apoio incondicional. Seu amor ilumina meus dias e me faz sentir segura e amada. Agradeço por cada risada compartilhada, por cada desafio superado juntos e por tudo que você faz para tornar nossa vida especial. Sou verdadeiramente abençoada por ter você ao meu lado. Te amo hoje mais que ontem.

As minhas filhas Geovana e Sofia Agradeço a cada uma de vocês por trazerem tanta alegria e amor à minha vida. Vocês são minha inspiração e meu maior orgulho. A forma como enfrentam a vida com coragem e bondade me enche de gratidão. Obrigada por cada sorriso, cada abraço e por serem quem vocês são. Ama-las é o maior presente que eu poderia ter. Estou sempre aqui para apoiá-las e celebrar cada conquista ao lado de vocês.

À Universidade Federal do Tocantins especialmente à coordenação do Mestrado em Agroenergia Digital e ao corpo docente pela oportunidade de realizar o Mestrado.

A professora Solange que, ao longo da jornada, gostaria de expressar minha mais profunda gratidão a minha orientadora, que desempenhou um papel fundamental durante toda a minha trajetória acadêmica. Sua orientação, paciência e dedicação foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. A cada desafio, suas valiosas sugestões e críticas construtivas me ajudaram a aprimorar minhas ideias e a alcançar meus objetivos de forma mais eficaz.

Ao professor Horllys, que me coorientou, com paciência e dedicação. Agradeço não apenas pela orientação técnica, mas também pelo apoio emocional e pela confiança que depositou em mim. Suas palavras de incentivo e seu compromisso com o meu

crescimento intelectual foram inspirações constantes ao longo deste processo. Sem sua orientação e apoio, este trabalho não seria possível. Sou eternamente grata pela oportunidade de aprender sob sua supervisão.

A professora Kauanne que contribuiu na dissertação escrita, sempre muito prestativa.

A minha amiga Karol obrigada, por toda a ajuda, as risadas, apoio emocional. amizade do LAM para a vida.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão a todos os meus colegas de laboratório de análises moleculares (LAM-UFT), Matheus, karolyne, Melissa e Roney que foram fundamentais durante minha jornada acadêmica. A colaboração, o apoio e o espírito de equipe que encontrei no laboratório tornaram este período ainda mais enriquecedor e prazeroso.

Agradeço pelas discussões construtivas, pelas trocas de ideias e pelas soluções criativas que surgiram a partir do nosso trabalho conjunto. Cada um de vocês contribuiu de maneira única para o meu aprendizado e crescimento profissional. As risadas, o trabalho em equipe e o companheirismo tornaram as longas horas de pesquisa mais leves e motivadoras.

Foi um privilégio poder aprender e trabalhar ao lado de pessoas tão talentosas e dedicadas. Sou muito grata por cada momento compartilhado no laboratório e por toda a amizade e colaboração que recebi de vocês.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tecidos coletados e utilizados para a extração de RNA. Raiz tuberosa (A), caule (B) e folha (C) de mandioca (cultivar Cacau) com seis meses de cultivo. Barra = 4 cm....34

Figura. 2: Principais métodos de extração de RNA utilizados em estudos de expressão gênica em mandioca, com base em pesquisa nas bases de dados *Web of Science* e *Scopus*, em 10 de abril de 2024, abrangendo o período de abril de 2024 até setembro de 202438

Figura. 3: Análise de integridade do RNA extraído de diferentes tecidos (raízes tuberosas, caules e folhas) de mandioca pelos métodos CTAB + Isopropanol (A), CTAB + Cloreto de lítio (B), Fenol Ácido (C) e TRIzol (D). Os géis de agarose (1,0%) foram corados com *Sybr Safe*. M – Marcador de peso molecular de 1 Kb. As letras R, C e F, referem-se, respectivamente, aos tecidos de raízes tuberosas, caules e folhas. Os números após a indicação do tecido representam cada repetição biológica.43

Figura 4: Níveis de expressão do gene-alvo *MeSBE-1* com base nos valores de Cq (Ciclo de quantificação) obtidos a partir das raízes tuberosas, caules e folhas de plantas de mandioca submetidas a diferentes métodos de extração de RNA: CTAB + Isopropanol, CTAB + cloreto de lítio e Fenol ácido. Os boxplots representam a distribuição da expressão gênica nos diferentes tecidos de mandioca a partir dos valores de Cq, sendo a linha central correspondente à mediana. Os valores de expressão foram obtidos a partir de quatro repetições biológicas.....46

Figura 5: Perfil de expressão relativa do gene *MeSBE-1* em diferentes tecidos (raízes tuberosas, caules e folhas) de mandioca (*Manihot esculenta*) utilizando o RNA extraído por três métodos (CTAB + Isopropanol, CTAB + Cloreto de lítio e Fenol ácido). Os boxplots representam a distribuição da expressão gênica nos diferentes tecidos de mandioca, onde a linha central indica a mediana. A normalização foi realizada em relação a uma amostra calibradora (repetição biológica I de folhas extraídas pelo método CTAB + Isopropanol). Para a quantificação relativa, os genes *MeU35* e *MeTUB* foram utilizados com genes de referência. Os valores de expressão foram obtidos a partir de quatro repetições biológicas.47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: *Primers* utilizados na RT-qPCR, nome do gene, sequência de primers, número de acesso, temperatura de melting (T_m), tamanho do amplicon, coeficiente de correlação (R^2) e eficiência de amplificação (E%) do gene-alvo e dos genes de referência.....36

Tabela 2: Comparação da qualidade do RNA isolado de tecidos de mandioca utilizando diferentes métodos de extração: CTAB com isopropanol na etapa de precipitação (CTAB + Isopropanol), CTAB com cloreto de lítio na etapa de precipitação, (CTAB + Cloreto de lítio), TRIzol e Fenol ácido. São apresentadas as quantidades de RNA obtidas, além das relações e A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} de pureza, com seus erros-padrão, calculados a partir de quatro repetições biológicas.....40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa com transcrição reversa
RNA	Ácido ribonucleico
cDNA	DNA complementar
Cq	Ciclo de quantificação
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
QTLs	<i>Quantitative trait locus</i>
MIQE Experiments	The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR
<i>SBE-1</i>	<i>Starch braching enzyme</i>
<i>UB35</i>	<i>Ubiquitina</i>
<i>TUB</i>	<i>β-tubulin</i>
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
PVP	Polivinilpirrolidona
EDTA	Ácido etileno diamono tetracético
TES	Tris-EDTA-Sal (NaCl)
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometa

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	12
2 – OBJETIVOS.....	14
2.1 – Objetivo Geral	14
2.2 – Objetivos específicos.....	14
3- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
3.1- A Importância da Cultura da Mandioca	14
3.2 - A mandioca como cultura Agroenergética.....	16
3.3- Análises moleculares.....	19
4– CONSIDERAÇÕES FINAIS	21
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
ARTIGO 1	27
ANÁLISE COMPARATIVA DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO VISANDO A OBTENÇÃO DE RNA DE QUALIDADE NA CULTURA DA MANDIOCA	27
RESUMO	28
ABSTRACT	29
1 – INTRODUÇÃO.....	30
2 – METODOLOGIA.....	31
2.1 - Coleta de material vegetal	31
2.2 - Seleção dos protocolos de extração de RNA	32
2.3 - Extração de RNA	33
2.4 - Tratamento com a DNase e síntese de cDNA.....	33
2.5 - Gene-alvo e genes de referência.....	33
2.6 - Desenho de primers.....	34
2.7 - Análise da expressão gênica por RT- qPCR	34
3- RESULTADOS	35
3.1- Métodos de extração de RNA	35
3.2 - Quantidade e pureza do RNA	36
3.3 - Integridade do RNA	38
3.4 - RT- qPCR: Análise dos valores de cqs e da expressão gênica	40
4 – DISCUSSÃO	43
4.1 - Métodos de extração de RNA	43

4.2 - Quantidade e pureza do RNA	45
4.3 - Integridade do RNA	46
4.4 - RT-qPCR: Análise dos valores de cqs e da expressão gênica	48
5 – CONCLUSÃO.....	50
6– REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
MATERIAL SUPLEMENTAR	56

1 - INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é considerada uma das principais culturas agrícolas não apenas em território brasileiro como também em diversos países como Nigéria, Tailândia e Indonésia, sendo fundamental para a subsistência e produção de alimentos (IBGE, 2024). Além de ser a base da alimentação à parte expressiva da população, a raiz é matéria-prima para a agroindústria gerando produtos como a farinha, que são fonte de renda para muitas famílias (FELIPE, 2018). A fécula e outros amidos modificados, têm seu uso em diversos segmentos, desde o alimentício até os com maior tecnologia empregada, como na indústria química, siderúrgica, petrolífera, dentre outros (FELIPE, 2018).

A mandioca é cultivada em aproximadamente 29,95 milhões de hectares, predominantemente no Continente Africano (60,9%), seguido pela Ásia (29,4%) e América (9,6%), com uma produção anual superior a 319 milhões de toneladas de raízes frescas (FAO, 2024).

Por ser uma cultura de fácil adaptação, a mandioca é cultivada em todos os estados brasileiros, situando-se entre os principais produtos agrícolas do país, em termos de área cultivada e valor de produção. O Brasil está entre os cinco maiores produtores mundiais, com 22.645 toneladas (FAO, 2024). No estado do Tocantins a produção vem se destacando, a safra de 2022/2023 chegou a 18,2 milhões de toneladas em uma área de 1,27 milhões de hectares (EMBRAPA, 2024).

Um dos principais desafios para a cultura da mandioca é aumentar a produção agrícola sem expandir a área cultivada. A raiz tuberosa, que é a principal parte comercial da planta, contém entre 19,7% e 36,8% de amido em seu peso fresco, variando conforme o genótipo. Essa característica confere à mandioca um grande potencial, não apenas como alimento, mas também como fonte para a produção de energias renováveis. (SUN et al., 2023).

Embora a mandioca seja vista como uma fonte energética de primeira geração, com uma participação de 2%, especialmente na China e na Tailândia, seu emprego é debatido devido ao impacto no aumento dos preços dos alimentos, resultante da crescente demanda por biocombustíveis. Esse aumento na demanda, por sua vez, provoca a transformação de alimentos em cultivos para bioenergia (FAO, 2024).

Nesse cenário, a produção de bioenergia a partir da biomassa residual da mandioca

surge como uma alternativa promissora, contribuindo para a redução do uso da terra e garantindo a segurança alimentar (OZOEKWU et al., 2017). Dessa forma, a gestão dos coprodutos agroindustriais da mandioca se torna essencial, pois a geração de biocombustíveis apresenta uma solução viável do ponto de vista econômico e tecnologicamente atraente, capaz de diminuir a demanda por energia e reduzir as emissões de gases de efeito estufa (JUSAKULVIJIT; BEZAMA; THRÄN, 2021). Isso resulta em benefícios ambientais, econômicos e sociais, especialmente diante do crescimento populacional e da diminuição da produção de combustíveis fósseis (ANDRÉS–MEZA et al., 2024).

Diante da crescente demanda por alimentos e da necessidade de melhorar a produtividade agrícola de forma sustentável, é essencial que os avanços na agricultura sejam acompanhados por inovações tecnológicas. O estudo e o melhoramento de culturas agrícolas desempenham um papel crucial nesse processo, uma vez que visam a otimização de características como resistência a pragas, tolerância a condições climáticas adversas e aumento do rendimento (SUN et al., 2023).

Nesse contexto, as análises moleculares se tornam ferramentas indispensáveis, permitindo uma compreensão mais profunda das bases genéticas que regulam essas características. Uma das técnicas mais relevantes nesse campo é a PCR em tempo real, que permite a detecção e quantificação precisa de genes de interesse, facilitando o entendimento de processos biológicos por meio da expressão gênica (REUBEN-KALU et al., 2023).

Nos estudos transcricionais, uma das etapas iniciais e mais importantes é o isolamento de RNA de alta qualidade. Assim, assegurar que o processo de extração de RNA seja conduzido por meio de um protocolo eficaz é essencial para garantir resultados consistentes (AHMAD et al., 2017; ZHU et al., 2017).

No isolamento de RNA de tecidos contendo grandes quantidades de metabólitos secundários, como folhas de mandioca e raízes de armazenamento, não é um processo muito fácil, pois esses compostos limitam fortemente a extração de RNA de alta qualidade (REUBEN-KALU et al., 2023). Amostras de RNA devem possuir alta qualidade e pureza para garantir a confiabilidade de estudos de expressão gênica (GONÇALVES et al., 2021).

A partir do desenvolvimento do presente estudo, serão identificados e validados métodos de extração de RNA, para que estudos moleculares de transcriptoma da cultura da mandioca sejam desenvolvidos.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

Comparar metodologias de extração de RNA para determinar o método mais eficiente no isolamento de RNA de alta qualidade a partir de raízes tuberosas, caules e folhas de plantas de mandioca

2.2 – Objetivos específicos

Realizar uma revisão da literatura para identificar as metodologias mais utilizadas para o isolamento de RNA de raízes tuberosas, caules e folhas de mandioca em estudos moleculares sensíveis.

Aperfeiçoar e adaptar protocolos de extração de RNA para cada tipo de tecido vegetal (raiz tuberosa, caule e folha), visando maximizar a qualidade e integridade do material genético obtido.

Validar a eficiência dos métodos de extração por meio da técnica de RT-qPCR, determinando o protocolo que proporciona o RNA de melhor qualidade.

3- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1- A Importância da Cultura da Mandioca

A mandioca pertencente ao gênero *Manihot* e a família Euphorbiaceae, abrange mais de 100 cultivares distribuídas do sudoeste da América do Norte ao norte da Argentina (ROGERS; APPAN, 1973; SILVA; SOARES; OLIVEIRA, 2017). As cultivares de *M. esculenta* apresentam variações na forma de crescimento e formato das folhas, provavelmente relacionada à ampla distribuição ecológica e geográfica do gênero (DUPUTIÉ; SALICK; MCKEY, 2011; SILVA, 2014; SILVA; INOCENCIO; ALONSO, 2016). Além disso, a mandioca é uma cultura tropical de raízes de armazenamento, com alto teor de amido, que fornece uma fonte básica e importante de alimento.

A cultura da mandioca está presente em todo o território nacional e se insere no contexto social dos agricultores brasileiros, principalmente daqueles com menor tecnologia investida, devido essa cultura apresentar certa robustez, não necessitando de cuidados tão

intensivos, tolerando adversidades climáticas (intempéries) e de solo (escassez de nutrientes), cultivada tanto em solos de terra firme quanto em solos de várzea (ANDRÉS–MEZA et al., 2024). A cultura da mandioca tem um valor social e econômico muito grande em especial nas regiões norte e nordeste, sendo por muitas vezes a única fonte de renda de agricultores (PINTO, 2010).

Dentro desse contexto, o cultivo de mandioca se destaca como uma das práticas mais importantes. Essa cultura sustenta muitas famílias que vivem em áreas rurais, utilizando a planta tanto para sua própria alimentação quanto para a produção de diversos subprodutos, como farinha de mandioca, farinha de tapioca e tucupí, que são vendidos e consumidos (PAULA et al., 2024).

O amido de mandioca possui aplicações em diversos setores, como a indústria alimentícia, biocombustíveis, farmacêutica, cosmética, têxtil, e de embalagens ecológicas. É comumente utilizado como agente espessante e estabilizante em diversos alimentos, como sopas, molhos, sobremesas e produtos de panificação. Suas características são apreciadas na criação de texturas específicas em alimentos e por ser livre de glúten e não causar alergias, o amido de mandioca é uma opção para a fabricação de produtos destinados a pessoas com intolerância ao glúten, como pães e massas sem glúten (AKPA; DAGDE, 2012; LUCHESE; RODRIGUES; TESSARO, 2021).

De acordo com a Embrapa, (2024), a produção de mandioca no Brasil é predominantemente destinada à alimentação humana, seja na forma *in natura* ou para as indústrias de farinha e amido. Essa cultura tem importante papel econômico e social, graças à sua fácil disseminação, resistência e múltiplas formas de aproveitamento. É cultivada em diferentes escalas de produção, desde pequenas propriedades até grandes empreendimentos, adaptando-se a variadas condições de solo e clima, além de diferentes níveis de tecnologia agrícola. A mandioca fornece alimentos, cria empregos e gera renda para milhões de pessoas, além de colaborar com a diversificação agrícola e a geração de divisas por meio das exportações.

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2024), no Tocantins, a cultura da mandioca ocupa uma área plantada de 15.615 hectares, com produção anual de 264 mil toneladas, ocupando a 17ª posição no ranking nacional. No âmbito estadual os municípios que mais se destacam são: Araguaína, Goiatins, Miracema, Wanderlândia,

Taguatinga, Formoso-do-Araguaia, Campos lindos, Caseara, São Bento e Aparecida do Rio Negro, que juntos somam mais de 84.000 toneladas de mandioca.

Assim, a cultura da mandioca apresenta grande multiplicidade de usos, seja para consumo humano, animal ou industrial, sendo uma importante fonte de carboidratos cultivada em diversas regiões do país, contribuindo para a diversificação da produção agrícola e para a segurança alimentar da população (CALLEGARI et al., 2021).

3.2 - A mandioca como cultura Agroenergética

Nas últimas décadas, a escassez de petróleo e a poluição causada pela queima de combustíveis fósseis, têm voltado a atenção mundial para a produção de combustíveis a partir de biomassa. A matriz energética mundial ainda é fortemente inclinada para as fontes de carbono fóssil, com participação total de 80%, sendo 36% de petróleo, 23% de carvão mineral e 21% de gás natural (EMBRAPA, 2024).

As raízes de mandioca possuem uma composição química predominantemente composta por água e carboidratos, sendo o amido o principal componente (UTSUMI et al., 2022). Essa composição pode variar de acordo com as características genéticas, às condições fisiológicas, o tipo de solo e os métodos de cultivo. De forma geral, a mandioca apresenta cerca de 63,4% de umidade, 32,0% de amido, 0,2% de açúcares totais, 0,7% de fibras, 1,0% de proteína, 0,4% de lipídios e 0,7% de cinzas (JOSÉ et al., 1993; OLIVEIRA; MORAES, 2009). Em variedades de mandioca açucarada, é comum encontrar níveis de umidade superiores a 80% (NEVES et al., 2013; SOUZA et al., 2013).

À medida que a população mundial e as atividades industriais continuam a crescer, o consumo geral de energia também tende a aumentar, resultando em níveis mais elevados de poluição. Projeta-se que até 2050 a população global cresça em mais de dois bilhões de pessoas (GRAHAM-ROWE, 2011). Em relação à energia, o consumo tem se intensificado com o avanço da produção de biocombustíveis, como o bioetanol e o biodiesel, originados de culturas alimentares (FARGIONE et al., 2008).

Na produção de etanol, a mandioca já é empregada para esse fim em países como China e Tailândia (FELIPE; ALVES; VIEIRA, 2013). Esse vegetal é uma fonte de amido, o que o torna adequado para a produção de etanol de primeira geração (POONSRISAWAT et al., 2017). Além disso, a mandioca também pode ser utilizada para a produção de etanol de

segunda geração, aproveitando resíduos como casca e caule (SELVAKUMAR; KAVITHA; SIVASHANMUGAM, 2019; SIVAMANI; BASKAR; CHANDRASEKARAN, 2020).

A produção de bioetanol é principalmente focada em ingredientes ricos em amido e açúcar, como cana-de-açúcar, mandioca e o milho, embora essas culturas sirvam principalmente como fonte de alimento (GUPTA; VERMA, 2015). É crucial desenvolver bioetanol a partir de matérias-primas que não sejam utilizadas como alimentos, como materiais lignocelulósicos, com cultivares específicas para este uso, que possibilitam o aproveitamento de resíduos agrícolas e industriais para a geração de bioenergia. (BAGUMA et al., 2003).

Neste contexto a mandioca açucarada se caracteriza por apresentar grandes quantidades de açúcares livres em suas raízes de reserva, devido a uma deficiência de uma das enzimas que convertem o açúcar em amido. Vieira et al., (2023), estudando genótipos de mandiocas açucaradas, verificaram que além do baixo teor de amido, comparado com outras variedades de mandioca, sendo por volta de 15%, as raízes açucaradas apresentam maior teor de glicose. Outra característica importante é que as mandiocas açucaradas, dependendo do genótipo, podem atingir mais de 90% de umidade e porcentagem de amido inferior a 5% (ARAÚJO; CUNHA; CUNHA, 2013).

A mandioca açucarada é uma mutação genética encontrada na Amazônia que, em vez de amido, acumula glicose e alto teor de água na raiz (em torno de 15% de amido e até 90% de umidade). Esta mutação, após processo de seleção e cruzamento, resultou em uma variedade produtiva com alto teor de açúcar fermentescível (ERENO, 2008). Diante desta diferenciação, com o objetivo de conservar tais variedades e explorar novas maneiras de uso da mandioca, estudos testam suas aplicabilidades dentro da indústria, como para produção de álcool, combustível e indústria de cosméticos, produção de xaropes naturais, bebidas fermentadas, dentre diversas outras aplicabilidades que podem ser descobertas em pesquisas (VIEIRA et al., 2023).

A cana-de-açúcar e o milho têm sido utilizados por décadas na fabricação de bioetanol no Brasil e nos Estados Unidos, respectivamente, por meio da extração de sacarose e amido, que são então convertidos para processos de fermentação. Nos últimos anos, o potencial da lignocelulose tem sido amplamente estudado para a produção de bioetanol e outros produtos químicos (PADELLA; O'CONNELL; PRUSSI, 2019). Mas, ainda são limitados os

processos industriais que visam a produção de produtos além do bioetanol, bem como a utilização eficiente da biomassa lignocelulósica dentro de uma biorrefinaria integrada (PATEL; SHAH, 2021).

A aplicação da cultura da mandioca na produção de etanol tem como objetivo central possibilitar uma fonte de biocombustível, enquanto o objetivo secundário é promover a participação da agricultura familiar nessa cadeia produtiva. Além disso, a mandioca, assim como a batata-doce, se destaca por seu desenvolvimento em regiões de baixa produtividade, sendo considerada uma das culturas mais baratas e sustentáveis (ZHANG et al., 2016). Estudos sobre o custo energético da produção agrícola e industrial de um litro de etanol a partir desta cultura indicam que a mandioca apresenta características significativas (CABELLO, 2006; SALLA et al., 2010). O custo de produção do etanol a partir da mandioca no Brasil varia entre R\$ 0,70 e R\$ 1,10 por litro, dependendo de fatores como preço da matéria-prima, eficiência do processamento e escala de produção. (SORAPIPATANA; YOOSIN, 2011).

No Brasil, a cultura da mandioca não pretende substituir a cana-de-açúcar na produção de etanol, mas pode representar uma opção para produtores de menor escala, com benefícios sociais para comunidades rurais ou ocupação de nichos agrícolas, em regiões em que o cultivo da cana não é viável. Entretanto, se o rendimento no cultivo da mandioca for melhorado, de forma a reduzir o custo da matéria-prima, a competitividade do etanol de mandioca poderá ser atingida, chegando a ser, em algumas regiões, mais barato que o da cana-de-açúcar. (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007).

Embora a produção de grandes tubérculos seja promissora, uma grande quantidade de resíduos de caule ainda não é aproveitada. Poucos estudos foram realizados sobre o uso da biomassa do caule da mandioca como matéria-prima para a produção de bioetanol, assim como sobre suas propriedades e as tecnologias necessárias para esse processo (SEPTIA et al., 2018). A expansão do uso de biomassa para a produção de combustíveis e produtos químicos, especialmente com foco em diferentes gerações de biomassa, reflete uma crescente preocupação com a sustentabilidade e a busca por fontes renováveis de energia e materiais. Cada geração de biomassa tem seu próprio conjunto de desafios e oportunidades, mas a tendência é buscar alternativas mais sustentáveis, como as de segunda e terceira gerações, para evitar a competição com recursos alimentares e reduzir os impactos ambientais da

produção de energia e produtos químicos (BRAGA et al., 2024).

A mandioca apresenta diversos pontos positivos para produção de etanol, dentre eles a possibilidade de cultivo junto com outras espécies em diferentes regiões do país, inclusive em climas áridos, o aproveitamento dos subprodutos do processamento e a colheita durante todo o ano sem exigência de mecanização complexa (PEDUZZI, 2009).

Além disso, tem vantagens de processamento sobre outras matérias-primas amiláceas pois requer menor temperatura de gelatinização e maior solubilidade em amilose, atingindo conversões acima de 94% (LÓPEZ-ULIBARRI; HALL, 1997) e rendimento de até 160 L de etanol por tonelada de mandioca processada (SORAPIPATANA; YOOSIN, 2011). A mandioca acumula carboidratos na forma de amido insolúvel, que deve ser gelatinizado por cozimento e submetido à hidrólise ácida ou enzimática para quebra da cadeia polimérica do amido e formação de monômeros de glicose. Esse hidrolisado pode, então, ser fermentado pela ação de microrganismos para produzir etanol (MUSSATTO et al., 2010).

Assim a abordagem sobre biocombustíveis tem sido crescente e, em consequência, os estudos voltados a culturas energéticas. Tem-se buscado, de maneira geral, maior diversificação de matérias-primas por proporcionarem a descentralização da produção, o que permite maior participação do pequeno agricultor (SOUZA et al., 2020), sendo o cultivo de mandioca um grande potencial, em razão da obtenção de novas variedades com maior produtividade, resistência a doenças e bom desenvolvimento em solos de baixa fertilidade (EMBRAPA, 2024). Todavia, alguns gargalos precisam ser solucionados para a viabilidade do uso da mandioca na produção de etanol.

Dessa forma, as técnicas de biotecnologia têm se apresentado como alternativas eficientes para o desenvolvimento de plantas com alto valor agregado para a agricultura ou indústria.

3.3- Análises moleculares

A engenharia genética é uma ferramenta essencial para o melhoramento vegetal, promovendo o aumento da produtividade de culturas agrícolas e fortalecendo a sustentabilidade na produção de alimentos. Por meio dessa técnica, os cientistas podem introduzir genes específicos para melhorar características desejadas, como resistência a

pragas, tolerância a condições adversas de crescimento ou aumento do teor nutricional (ABDUL AZIZ et al., 2022).

Os aspectos moleculares, que atuam em diferentes mecanismos fisiológicos, como, por exemplo, a resistência a doenças, é essencial para a melhoria da cultura da mandioca. Nesse contexto, diferentes ferramentas moleculares são frequentemente utilizadas quando se objetiva o estudo desses processos (CAO et al., 2022; XIA et al., 2022). Entre essas ferramentas, a técnica de PCR em tempo real, (RT-qPCR), é amplamente usada e se destaca por sua capacidade de quantificar de forma precisa a expressão de genes específicos (MAGAR; LIU; YAN, 2022). O uso da RT-qPCR, em estudos de mandioca, tem aumentando nos últimos anos, permitindo melhor compreensão dos diferentes mecanismos moleculares, como o desenvolvimento e a resposta da planta a estresses ambientais. No estudo de Saithong et al., (2013), a técnica de RT-qPCR foi utilizada com sucesso, para quantificar a expressão de genes envolvidos no processo de biossíntese de amido, em resposta ao estresse hídrico e à infecção por patógenos.

A extração de RNA é o primeiro passo para estudos de expressão gênica, incluindo PCR quantitativa, construção de bibliotecas de cDNA e RNAseq. No entanto, a obtenção de RNA de qualidade a partir de tecidos ricos em polifenóis e polissacarídeos é um desafio, como ocorre na mandioca, que apresenta alto teor de amido. (UTSUMI et al., 2022).

Metabólitos secundários, como polissacarídeos e polifenóis, presentes em tecidos vegetais ricos em amido, podem causar interferências significativas, degradar ou se coprecipitar com o RNA durante a purificação de nucleotídeos. Isso ocorre devido às semelhanças nas propriedades físicas e químicas entre o RNA e os polissacarídeos. A remoção da coprecipitação de amido durante o processo de extração de RNA resulta em maior rendimento e em RNA total de melhor qualidade (IMPA et al., 2020; VENNAPUSA et al., 2020).

O processo de extração de RNA é uma etapa fundamental, em estudos moleculares, uma vez que o isolamento de um RNA de qualidade impacta diretamente os resultados obtidos (SOUZA et al., 2021). Dessa forma, a obtenção de RNA livre de contaminantes e com alta integridade é fundamental, pois a qualidade do RNA extraído está diretamente relacionada à precisão e confiabilidade da RT-qPCR (Gonçalves et al., 2021).

No entanto, não há um protocolo universal de extração de RNA que seja eficaz para

todas as espécies. Assim, estudos em diferentes organismos têm sido desenvolvidos para avaliar, otimizar e definir os melhores protocolos de extração de RNA (GONÇALVES et al., 2021). Porém, no caso da cultura da mandioca, as pesquisas disponíveis na literatura ainda são escassas.

Diante disso, a otimização e validação de protocolos de extração de RNA são fundamentais, pois constituem a base para estudos avançados de expressão gênica, como RT-qPCR e RNA-seq. Além disso, esses protocolos podem ser utilizados para isolar genes em técnicas de edição gênica, como CRISPR/Cas9. A obtenção de RNA de qualidade é fundamental para o desenvolvimento de técnicas moleculares.

4– CONSIDERAÇÕES FINAIS

A mandioca é uma cultura agrícola de grande importância no Brasil e em outros países tropicais, tanto para a subsistência quanto para a produção de alimentos processados. Com uma produção expressiva e crescente, ela desempenha um papel vital na segurança alimentar e na diversificação da agricultura. No entanto, o avanço nos estudos moleculares sobre a mandioca é fundamental para o aprimoramento da cultura. Nesse contexto, a técnica de RT-qPCR se destaca como uma ferramenta poderosa para quantificar a expressão gênica e compreender os mecanismos moleculares envolvidos.

Para que a RT-qPCR forneça resultados precisos e confiáveis, a qualidade da extração de RNA é uma etapa crítica. A obtenção de RNA íntegro e livre de contaminantes é essencial para garantir a reprodutibilidade dos experimentos e a correta interpretação dos dados. No entanto, a falta de protocolos padronizados e otimizados para a extração de RNA de mandioca representa um desafio significativo para a realização desses estudos. Portanto, a escassez de informações sobre métodos adequados para a cultura da mandioca ressalta a importância de pesquisas focadas na avaliação e otimização desses protocolos.

Este estudo contribui para preencher essa lacuna ao comparar diferentes metodologias de extração de RNA, com o objetivo de identificar o protocolo mais eficaz para tecidos específicos da mandioca. Os resultados obtidos não só são fundamentais para o aprimoramento de estudos moleculares nessa cultura, mas também podem auxiliar no desenvolvimento de estratégias para aumentar a produtividade e a tolerância da mandioca a estresses bióticos. Assim, a pesquisa apresentada representa um avanço significativo para a

biotecnologia aplicada à mandioca, que, por sua vez, pode contribuir para o fortalecimento da cadeia produtiva e sustentabilidade da cultura.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL AZIZ, M. et al. Genetically engineered crops for sustainably enhanced food production systems. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 2022.

AHMAD, J. et al. Comparative assessment of four RNA extraction methods and modification to obtain high-quality RNA from *Parthenium hysterophorus* leaf. **3 Biotech**, v. 7, n. 6, 1 dez. 2017.

AKPA, J. G.; DAGDE, K. K. Modification of Cassava Starch for Industrial Uses. **International Journal of Engineering and Technology**, v. 2, n. 6, 2012.

ANDRÉS-MEZA, P. et al. Cassava cultivation; current and potential use of agroindustrial co-products. **AIMS Environmental Science**, v. 11, n. 2, p. 248–278, 2024.

ARAÚJO, F. DAS C. B. DE; CUNHA, R. L.; CUNHA, E. F. M. **Concentração de carboidratos e umidade em raízes de mandioca açucarada (*Manihot esculenta* Crantz) Pará**. Anais do 17º Seminário De Iniciação Científica Da Embrapa Amazônia Oriental, 1º Seminário De Pós-Graduação Da Embrapa Amazônia Oriental. **Anais...**Belém-PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2013.

BAGUMA, Y. et al. Expression patterns of the gene encoding starch branching enzyme II in the storage roots of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Plant Science**, v. 164, n. 5, p. 833–839, 2003.

BRAGA, M. et al. Meeting Brazilian challenges for a bio-based economy: the case of alcohols and carboxylic acids. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 14, n. 13, p. 14405–14423, 2024.

CABELLO, C. **Produtos derivados de fécula de mandioca-etanol**. Workshop sobre Tecnologias em Agroindústrias de Tuberosas Tropicais. **Anais...**Botucatu: UNESP, 2006.

CALLEGARI, D. M. et al. Changes in transcript levels of cassava superoxide dismutase and catalase during interaction with *Phytophthora* sp. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 114, 1 abr. 2021.

CAO, M. et al. Transcriptomic profiling suggests candidate molecular responses to waterlogging in cassava. **PLoS ONE**, v. 17, n. 1 January, 1 jan. 2022.

CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, Ó. J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2415–2457, 2007.

DUPUTIÉ, A.; SALICK, J.; MCKEY, D. Evolutionary biogeography of *Manihot* (Euphorbiaceae), a rapidly radiating Neotropical genus restricted to dry environments. **Journal of Biogeography**, v. 38, n. 6, p. 1033–1043, 1 jun. 2011.

EMBRAPA. **Mandioca**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/mandioca>>. Acesso em: 6 out. 2024.

ERENO, D. Etanol de mandioca doce. **Revista Fapesp**, v. 144, p. 68–73, 2008.

FAO. **Crops and livestock products.** Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>>. Acesso em: 6 out. 2024.

FARGIONE, J. et al. Land Clearing and the Biofuel Carbon Debt. **Science**, v. 319, n. 5867, p. 1235–1238, 29 fev. 2008.

FELIPE, F. I. **Os desafios na cadeia produtiva da mandioca no Brasil.** CEPEA – Centro de estudos avançados em economia aplicada. Disponível em: <<https://cepea.esalq.usp.br/br/opiniaocpepea/os-desafios-na-cadeia-produtiva-da-mandioca-no-brasil.aspx>>. Acesso em: 6 out. 2024.

FELIPE, F. I.; ALVES, L. R. A.; VIEIRA, R. M. Produção na Tailândia versus Brasil. **Agroanalysis**, v. 33, n. 3, p. 28, 2013.

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.

GRAHAM-ROWE, D. Agriculture: Beyond food versus fuel. **Nature**, v. 474, n. 7352, p. S6–S8, 2011.

GUPTA, A.; VERMA, J. P. **Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Elsevier Ltd, , 2015.

IBGE. **Produção de Mandioca.** Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/mandioca/br>>. Acesso em: 6 out. 2024.

IMPA, S. M. et al. High night temperature induced changes in grain starch metabolism alters starch, protein, and lipid accumulation in winter wheat. **Plant Cell and Environment**, v. 43, n. 2, p. 431–447, 1 fev. 2020.

JOSÉ, S. et al. Composição centesimal da raiz de 10 variedades de mandioca. (*Manihot esculenta* Crantz) cultivadas em Minas Gerais. **Revista brasileira de mandioca**, v. 12, n. 1–2, p. 7–12, 1993.

JUSAKULVIJIT, P.; BEZAMA, A.; THRÄN, D. The Availability and Assessment of Potential Agricultural Residues for the Regional Development of Second-Generation Bioethanol in Thailand. **Waste and Biomass Valorization**, v. 12, n. 11, p. 6091–6118, 2021.

LÓPEZ-ULIBARRI, R.; HALL, G. M. Saccharification of cassava flour starch in a hollow-fiber membrane reactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, n. 6, p. 398–404, 1997.

LUCHESE, C. L.; RODRIGUES, R. B.; TESSARO, I. C. Cassava starch-processing residue utilization for packaging development. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 2238–2247, 2021.

MUSSATTO, S. I. et al. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 817–830, 2010.

NEVES, D. A. et al. Avaliação da qualidade da mandiocaba no pós-colheita. **Higiene Alimentar**, v. 27, n. 218/219, p. 124–129, 2013.

OLIVEIRA, M. A. DE; MORAES, P. S. B. DE. Características físico-químicas, cozimento e produtividade de mandioca cultivar IAC 576-70 em diferentes épocas de colheita. **Ciência e**

Agrotecnologia, v. 33, 2009.

OZOEKWU, C. G. et al. Biomass and bioenergy potential of cassava waste in Nigeria: Estimations based partly on rural-level garri processing case studies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 72, p. 625–638, 2017.

PADELLA, M.; O'CONNELL, A.; PRUSSI, M. **What is still limiting the deployment of cellulosic ethanol? Analysis of the current status of the sector**. **Applied Sciences (Switzerland)**MDPI AG, , 1 nov. 2019.

PATEL, A.; SHAH, A. R. Integrated lignocellulosic biorefinery: Gateway for production of second generation ethanol and value added products. **Journal of Bioresources and Bioproducts**, v. 6, n. 2, p. 108–128, 2021.

PAULA, M. T. DE et al. Aspectos socioeconômicos e agronômicos da cultura da mandioca (*Manihot esculenta* crantz): uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 7, n. 3, p. e73257, 2 out. 2024.

PEDUZZI, P. **Produção de etanol a partir da mandioca pode ser mais barata do que com a cana**. Disponível em: <<https://www.uece.br/agin/noticias/producao-de-etanol-a-partir-da-mandioca-pode-ser-mais-barata-do-que-com-a-cana/>>. Acesso em: 6 out. 2024.

PINTO, F. C. Aspectos da Cadeia Produtiva da Mandioca em Feira de Santana no Distrito de Maria Quitéria (Povoados de Lagoa Grande e Olhos D'água Das Moças). **ReAC – Revista de Administração e Contabilidade. Faculdade Anísio Teixeira (FAT)**, v. 2, n. 1, p. 65–73, 2010.

POONSRIAWAT, A. et al. Simultaneous saccharification and viscosity reduction of cassava pulp using a multi-component starch- and cell-wall degrading enzyme for bioethanol production. **3 Biotech**, v. 7, n. 5, p. 290, 2017.

REUBEN-KALU, J. I. et al. Precise isolation of high-quality RNA from leaves and storage roots of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) for gene expression studies. **Bulletin of the National Research Centre**, v. 47, n. 1, 9 jun. 2023.

ROGERS, D. J.; APPAN, S. G. *Manihot Manihotoides* (Euphorbiaceae). **Flora Neotropica**, v. 13, p. 1–272, 1973.

SAITHONG, T. et al. Starch biosynthesis in cassava: a genome-based pathway reconstruction and its exploitation in data integration. **BMC Systems Biology**, v. 7, n. 1, p. 75, 2013.

SALLA, D. A. et al. Análise energética de sistemas de produção de etanol de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, 2010.

SELVAKUMAR, P.; KAVITHA, S.; SIVASHANMUGAM, P. Optimization of Process Parameters for Efficient Bioconversion of Thermo-chemo Pretreated *Manihot esculenta* Crantz YTP1 Stem to Ethanol. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 8, p. 2177–2191, 2019.

SEPTIA, E. et al. Characterization and ethanol potential from giant cassava (*Manihot esculenta*) stem waste biomass. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 144, n. 1, p. 012042, 2018.

SILVA, M. J. DA. *Manihot veadeirensis* (Euphorbiaceae s. s.): a New Species from the Brazilian Cerrado. **Systematic Botany**, v. 39, n. 4, p. 1161–1165, 2014.

SILVA, M. J. DA; INOCENCIO, L. DE S.; ALONSO, A. A. *Manihot allemii* sp. nov. (Euphorbiaceae s.s.) with entire and unlobed leaves from northern Brazil, with notes about foliar anatomy. **Nordic Journal of Botany**, v. 34, n. 2, p. 134–140, 1 fev. 2016.

SILVA, M. J. DA; SOARES, T. N.; OLIVEIRA, P. R. O. Morphological characteristics and genetic evidence reveals a new species of *Manihot* (Euphorbiaceae, Crotonoideae) from Goiás, Brazil. **PhytoKeys**, v. 77, p. 99–111, mar. 2017.

SIVAMANI, S.; BASKAR, R.; CHANDRASEKARAN, A. P. Response surface optimization of acid pretreatment of cassava stem for bioethanol production. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 39, n. 2, p. e13335, 1 mar. 2020.

SORAPIPATANA, C.; YOOSIN, S. Life cycle cost of ethanol production from cassava in Thailand. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Renewable and Sustainable Energy Reviews. v. 15, n. 2, p. 1343–1349, 2011.

SOUZA, H. A. L. DE et al. Physicochemical properties of three sugary cassava landraces. **Ciência Rural**, v. 43, 2013.

SOUZA, M. R. DE et al. Comparação de métodos de extração de RNA aplicados a culturas amiláceas utilizadas na produção de etanol: uma revisão bibliográfica. **Revista Desafios**, v. 7, n. 3, p. 134–144, 2020.

SOUZA, M. R. DE et al. Comparative assessment of three RNA extraction methods for obtaining high-quality RNA from *Candida viswanathii* biomass. **Journal of Microbiological Methods**, v. 184, p. 106200, 2021.

SUN, J. et al. Cellulose and Lignin Contents are Negatively Correlated with Starch Accumulation, and Their Correlation Characteristics Vary Across Cassava Varieties. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 42, n. 2, p. 658–669, 1 fev. 2023.

UTSUMI, Y. et al. Suppressed expression of starch branching enzyme 1 and 2 increases resistant starch and amylose content and modifies amylopectin structure in cassava. **Plant Molecular Biology**, v. 108, n. 4–5, p. 413–427, 1 mar. 2022.

VENNAPUSA, A. R. et al. A universal method for high-quality RNA extraction from plant tissues rich in starch, proteins and fiber. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

VIEIRA, E. A. et al. BRS 438: Sugary cassava cultivar for diversification of the use of storage roots. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 23, 2023.

XIA, Y. et al. Genome-wide identification and expression analysis of ammonium transporter 1 (AMT1) gene family in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and functional analysis of MeAMT1;1 in transgenic Arabidopsis. **3 Biotech**, v. 12, n. 1, 1 jan. 2022.

ZHANG, M. et al. Biorefinery approach for cassava-based industrial wastes: Current status and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 50–62, 2016.

ZHU, G. et al. Intertwining DNA-RNA nanocapsules loaded with tumor neoantigens as synergistic nanovaccines for cancer immunotherapy. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1482, 2017.

ARTIGO 1

ANÁLISE COMPARATIVA DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO VISANDO A OBTENÇÃO DE RNA DE QUALIDADE NA CULTURA DA MANDIOCA

Gizela Maria de Araújo Sousa^{1,2}; Matheus Martins Daúde¹; Jaderson Roney Gomes de Oliveira^{1,3}; Domício Rodrigues Brito³; Gustavo Azevedo Campos⁵; Solange Aparecida Ságio²; Horllys Gomes Barreto^{1,2,3*}

¹Laboratory of Molecular Analysis (LAM), Life Sciences Department, Federal University of Tocantins, Palmas, TO, Brazil. <https://orcid.org/0000-0001-6595-8533>.

²Postgraduate Program in Digital Agroenergy, Federal University of Tocantins, Palmas, TO, Brazil.

³Postgraduate Program in Biodiversity and Biotechnology, Rede BIONORTE, Federal University of Tocantins, Palmas, TO, Brazil.

⁴Instituto de Desenvolvimento Rural do Estado do Tocantins - Ruraltins, Palmas, TO, Brazil.

⁵Embrapa Pesca, Aquicultura e Sistemas Agrícolas, NSA – Núcleo de Sistemas Agrícolas, Palmas, TO, Brazil.

***Corresponding author:**

Horllys Gomes Barreto

Laboratory of Molecular Analysis (LAM)

Department of Life Sciences

Federal University of Tocantins/UFT, University Campus of Palmas, TO, Brazil.

Postal code: 77.001-090

E-mail: horllys@uft.edu.br

RESUMO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é considerada como uma das principais culturas agrícolas, não apenas em território brasileiro, como também em diversos outros países. Para entender os processos moleculares que regulam o desenvolvimento e a resistência da mandioca a doenças, por exemplo, é essencial o uso de ferramentas moleculares avançadas. A extração de RNA é uma etapa fundamental em estudos moleculares. Entretanto, o processo de extração é complexo e requer cuidados para evitar a degradação do RNA e assegurar a pureza da amostra. O objetivo deste trabalho foi realizar uma análise comparativa de três métodos de isolamento de RNA e identificar o protocolo mais adequado para a extração de RNA de qualidade a partir de três tecidos de mandioca: raiz tuberosa, caule e folha. Foram comparados os métodos CTAB (com duas formas de precipitação), TRIzol e Fenol Ácido. Dos três métodos de extração testados neste trabalho, o método CTAB, com otimizações usando precipitação com cloreto de lítio, permitiu o isolamento de RNA de alta qualidade de raiz, caule e folha atendendo aos níveis sugeridos de quantidade e pureza e foi possível obter quantidades suficientes para o desenvolvimento de ensaios moleculares.

Palavras-chave: Transcriptoma, Expressão gênica, RT-qPCR, *Manihot esculenta*.

ABSTRACT

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is considered one of the main agricultural crops, not only in Brazilian territory but also in several other countries. To understand the molecular processes that regulate the development and resistance of cassava to diseases, for example, the use of advanced molecular tools is essential. RNA extraction is a fundamental step in molecular studies. However, the removal process is complex and requires care to avoid degradation of the RNA and ensure sample purity. The objective of this work was to perform a comparative analysis of three RNA isolation methods and identify the most appropriate protocol for extract quality RNA from three cassava tissues: tuberous root, stem and leaf. The CTAB methods (two precipitation way), TRIzol and Acid Phenol were compared. Of the three extraction methods tested in this work, the CTAB method, with optimizations using lithium chloride precipitation, allowed the isolation of high-quality RNA from root, stem and leaf with the suggested levels of quantity and purity and it was sufficient for the development of molecular assays.

Keywords: Transcriptome. Gene expression. RT-qPCR, bioethanol *Manihot esculenta*.

1 – INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) tem despertado crescente interesse global devido à versatilidade de usos de suas raízes tuberosas, que desempenham um papel fundamental tanto na segurança alimentar quanto no setor agroindustrial (IMMANUEL et al., 2024; ANYANWU et al., 2015). Amplamente utilizada na culinária em uma variedade de pratos tradicionais, a mandioca também se destaca como matéria-prima para a produção de diversos produtos industrializados, incluindo farinha, fécula, amidos modificados, etanol, bioplástico (OTEKUNRIN, 2024; ALZATE et al. 2024; FATHANAH et al., 2018).

Atualmente, a mandioca é cultivada em aproximadamente 29,95 milhões de hectares, com a maior parte dessa área localizada no continente africano (60,9%), seguido pela Ásia (29,4%) e pelas Américas (9,6%), resultando em uma produção total superior a 319 milhões de toneladas de raízes frescas (FAO, 2024).

Apesar da relevância econômica e da ampla adaptação da mandioca a diferentes condições ambientais, sua produtividade é frequentemente afetada por fatores bióticos, como pragas e doenças, e abióticos, como seca e baixa fertilidade do solo (DEVI et al., 2022; TIZE et al., 2021). Esses desafios comprometem a estabilidade da produção e reforçam a necessidade de estratégias inovadoras para o melhoramento genético da cultura. Nesse contexto, ferramentas moleculares desempenham um papel crucial ao possibilitar a identificação de genes associados à tolerância a estresses e à eficiência no uso de nutrientes, permitindo o desenvolvimento de variedades mais produtivas (CHARLES 2024; SIVAN et al., 2025)

Entre as ferramentas moleculares, a análise do transcriptoma via sequenciamento de RNA (RNA-seq) e a PCR em tempo real com transcrição reversa (RT-qPCR) permitem o estudo aprofundado de processos biológicos em plantas. O RNA-seq possibilita a quantificação global da expressão gênica, fornecendo uma visão abrangente dos perfis de transcrição, enquanto o RT-qPCR oferece uma abordagem altamente sensível e específica para a quantificação da expressão de genes-alvo (BUSTIN et al., 2005; MAGAR; LIU; YAN, 2022). No entanto, o desenvolvimento e o sucesso dessas técnicas, fundamentais para a compreensão dos processos biológicos e para o melhoramento vegetal, dependem diretamente do isolamento de RNA de alta qualidade, para garantir a confiabilidade dos resultados (LUCHO et al., 2018; PFAFFL, 2004).

O processo de extração de RNA é uma etapa crucial em estudos transcriptômicos, uma vez que o isolamento de um RNA de qualidade impacta diretamente os resultados obtidos (SOUZA et al., 2020). Dessa forma, é essencial obter um RNA livre de contaminantes, como polissacarídeos, polifenóis, proteínas e outros metabólitos secundários), além de garantir uma quantidade adequada as análises. No entanto, não existe um protocolo universal de extração de RNA que seja eficaz para o isolamento em qualquer tecido ou espécie.

Assim, estudos em diferentes organismos têm sido desenvolvidos para avaliar, otimizar e definir os melhores métodos de extração de RNA, como é o caso do cafeeiro (DE PAULA et al, 2012), batata-doce (GONÇALVES et al., 2021), Ginkgo biloba (ZHANG et al.,2021) e arroz (WAKASA, 2025). No caso da mandioca, Behnam et al., (2019) otimizaram um protocolo para o isolamento de RNA de alta qualidade a partir de seus tecidos, enquanto Guan et al., (2019) desenvolveram um estudo comparativo com quatro metodologias e observaram que o método TM modificado, que utiliza o tampão Trizol durante o processo de extração, apresentou os melhores resultados.

Diante desse cenário, nosso estudo teve como objetivo preencher essa lacuna por meio de uma análise preliminar das principais metodologias utilizadas em estudos via RT-qPCR, o que permitiu a comparação de três dos métodos mais amplamente empregados em plantas. Com isso, buscamos fornecer uma avaliação detalhada e comparativa dessas abordagens, contribuindo para a escolha de protocolos mais eficientes e acessíveis para pesquisas futuras sobre expressão gênica em mandioca.

2 – METODOLOGIA

2.1 - Coleta de material vegetal

O material vegetal foi coletado no Viveiro DelMudas, Polo São João, entre as cidades de Palmas-TO e Porto Nacional-TO (Coordenadas: 10°26'55.7" S e 48°20'39.9"). O cultivo da mandioca em Palmas, Tocantins, apresenta condições favoráveis devido ao clima tropical semiúmido da região, com uma estação chuvosa de outubro a abril e uma estação seca de maio a setembro. Os tecidos coletados foram: raiz tuberosa, caule (entrenós) e folha (novas) de mandioca (cultivar Cacau), com seis meses de cultivo (Figura 1). A coleta dos tecidos foi

realizada duas vezes: primeira coleta em novembro de 2022 (estação chuvosa) e segunda coleta realizada em junho de 2023 (estação seca), para garantir a otimização dos protocolos utilizados. O experimento foi conduzido com quatro repetições biológicas para cada tecido, no qual cada repetição foi constituída por três plantas distintas. Em seguida, o material vegetal coletado em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o momento da extração de RNA, realizada no Laboratório de Análises Moleculares da UFT, câmpus Palmas.

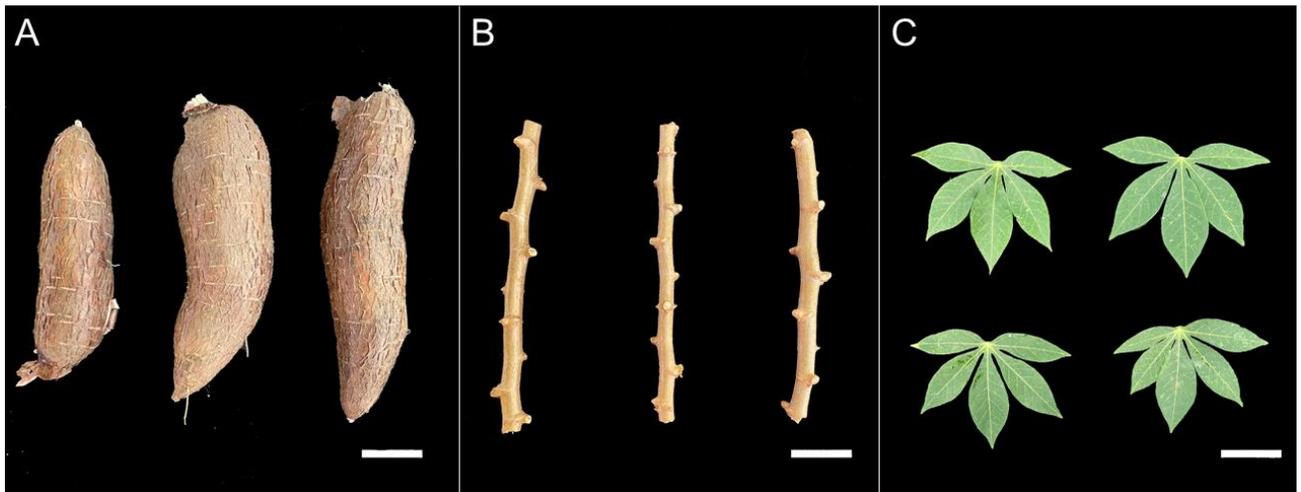


Fig.1: Tecidos coletados e utilizados para a extração de RNA. Raiz tuberosa (A), caule (B) e folha (C) de mandioca (cultivar Cacau) com seis meses de cultivo. Barra = 4 cm.

2.2 - Seleção dos protocolos de extração de RNA

A seleção dos protocolos de extração de RNA avaliados na cultura da mandioca foi realizada da seguinte forma: uma pesquisa na base de dados do Web of Science (<https://www.webofknowledge.com>) e Scopus (<https://www.scopus.com>), utilizando as seguintes palavras-chave: “gene expression”, “RNA extraction”, “RT-qPCR” e “cassava/Manihot esculenta”, por meio do interpolador booleano “and”. Após a pesquisa, três protocolos foram escolhidos: CTAB (cetiltrimetilamônio) (CHANG; PURYEAR; CAIRNEY, 1993), TRIzol (Invitrogen) e Fenol Ácido.

2.3 - Extração de RNA

Foram avaliadas três metodologias de extração de RNA: CTAB (CHANG; PURYEAR; CAIRNEY, 1993) modificado por (GONÇALVES et al., 2021) e com pequenas alterações (DAÚDE et al., 2023), utilizando dois métodos de precipitação (isopropanol ou cloreto de lítio); TRIzol (Invitrogen); e Fenol ácido, ambos realizados de acordo com as instruções dos fabricantes, com pequenas modificações (Material suplementar S1). Após a extração, a quantidade e a pureza do RNA obtido foram determinadas utilizando um espectrofotômetro (Nanodrop® One). As razões A260/A280 e A260/A230 foram utilizadas para avaliar a pureza, enquanto a integridade do RNA foi verificada por meio da eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

2.4 - Tratamento com a DNase e síntese de cDNA

As amostras de RNA (5µg) foram tratadas com DNase I utilizando o kit Turbo DNA-free (Ambion) para remover qualquer contaminação residual de DNA. Em seguida, o RNA foi avaliado quanto à quantidade e pureza, utilizando as razões A260/A280 e A260/A230, por meio da quantificação em espectrofotômetro (Nanodrop® One Spectrophotometer). A integridade do RNA foi analisada pela técnica de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com 3 µL de syber safe, 70 ml de tampão e 4 µL de marcador de peso molecular (50 minutos, voltagem 90V). O cDNA foi sintetizado a partir de 1,0 µg de RNA tratado livre de DNA, utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), seguindo rigorosamente o protocolo do fabricante. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20 °C.

2.5 - Gene-alvo e genes de referência

Para validar o melhor método de extração de RNA entre os protocolos testados, foi realizada uma análise da expressão do gene Starch-Branching Enzyme 1 de mandioca (MeSBE-1), que codifica a enzima amilotransferase, envolvida na síntese e acúmulo de amido (PEI et al., 2015). Os genes Ubiquitin (MeU35) e Tubulin (MeTUB) foram utilizados como genes de referência (SALCEDO; ZAMBRANA; SIRITUNGA, 2014).

2.6 - Desenho de primers

As sequências do gene-alvo e dos genes referência foram obtidas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) a partir dos códigos de acesso descritos por Pei et al., (2015) e Salcedo; Zambrana; Siritunga, (2014), respectivamente. Os primers para RT-qPCR foram desenhados utilizando o programa OligoPerfect (apps.thermofisher.com/apps/oligoperfect/). A qualidade dos primers foi avaliada por meio da ferramenta OligoAnalyzer (www.idtdna.com/calc/analyzer) (Tabela 1).

Tabela 1: Primers utilizados na RT-qPCR, nome do gene, sequência de primers, número de acesso, temperatura de melting (T_m), tamanho do amplicon, coeficiente de correlação (R^2) e eficiência de amplificação (E%) do gene-alvo e dos genes de referência.

Nome do gene	Sequência de primers (5'–3')	Número de acesso	T_m (°C)	Amplicon (pb)	R^2	E (%)
<i>SBE-1</i>	Fw: GGTTCCTTTGGGTCTGTTTCC	MK086025.1	60	92	0,99	93,5
	Rv: TGACAGTTTCTTTCCACAGCC		62,8			
<i>U35</i>	Fw: AAAACGAATGAGGCTGAAGC	DB924072	61	85	0,99	90,4
	Rv: AGTTTCCACCACAACATCAT		60,1			
<i>TUB</i>	Fw: TAGCACCCACACAAGCACA	XM_021749099.2	66,2	150	0,99	96,0
	Rv: CCACATTGTCCACCTTGAACG		63,4			

2.7 - Análise da expressão gênica por RT- qPCR

Para a análise da expressão gênica por RT-qPCR, utilizou-se o termociclador modelo ABI PRISM 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems), com PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems) e cDNA sintetizado a partir do RNA extraído de todos os tecidos nas diversas condições estudadas. As condições de reação foram: 2 minutos a 50°C (conversão do RNA para cDNA), 2 minutos a 95°C (ativação da Taq polimerase), seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturação) e 1 minuto a 60°C (anelamento e extensão).

Para confirmar a especificidade dos primers, a eficiência foi testada por RT-qPCR: onde foi gerada a curva de melting após os 40 ciclos de amplificação, seguindo as condições

térmicas: 15 segundos a 95°C (etapa 1), 1 minuto a 60°C (etapa 2) e 15 segundos a 95°C (etapa 3). A transição da etapa 2 para a etapa 3 ocorreu com um aumento gradual de aproximadamente 1°C por minuto até atingir 95°C.

Para cada reação, foram utilizados 1,0 µL de cDNA (diluído 1:10), 3,6 µL de água livre de nucleases, 0,2 µL de cada primer a 10 µM e 5,0 µL de PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, totalizando 10 µL por reação. As amostras foram processadas em triplicatas técnicas e os níveis de expressão do gene-alvo foram determinados pelos valores de Cq (ciclo de quantificação). O Cq foi definido como o número de ciclos no qual a fluorescência gerada na reação cruzou a linha de threshold.

O modelo matemático proposto por Pfaffl, (2004) foi utilizado para calcular a expressão relativa do gene SBE-1. A expressão do gene MeSBE-1 foi normalizada em relação aos genes de referência MeUB35 e MeTUB (SALCEDO; ZAMBRANA; SIRITUNGA, 2014). Os gráficos de expressão relativa foram gerados utilizando o programa SigmaPlot (versão 12.0, Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA). O teste de média foi realizado segundo o teste de Scott-Knott ($p \leq 0.05$).

3- RESULTADOS

3.1- Métodos de extração de RNA

A busca pelos artigos nas bases de dados *Web of Science e Scopus* resultou na seleção de 45 estudos relacionados à técnica RT-qPCR em mandioca. A análise das metodologias revelou que a maioria dos trabalhos desenvolvidos utilizou kits comerciais para a extração de RNA (59,18%), seguidos por métodos amplamente utilizados em plantas, como CTAB (18,37%), Fenol ácido (18,37%) e TRIzol (4,08%) para isolar o RNA total (figura 2) A preferência por kits pode estar relacionada à dificuldade de extração de RNA do tecido, mais estudado da espécie, a raiz tuberosa, que possui alto teor de amido e compostos fenólicos, comprometendo a qualidade do RNA.

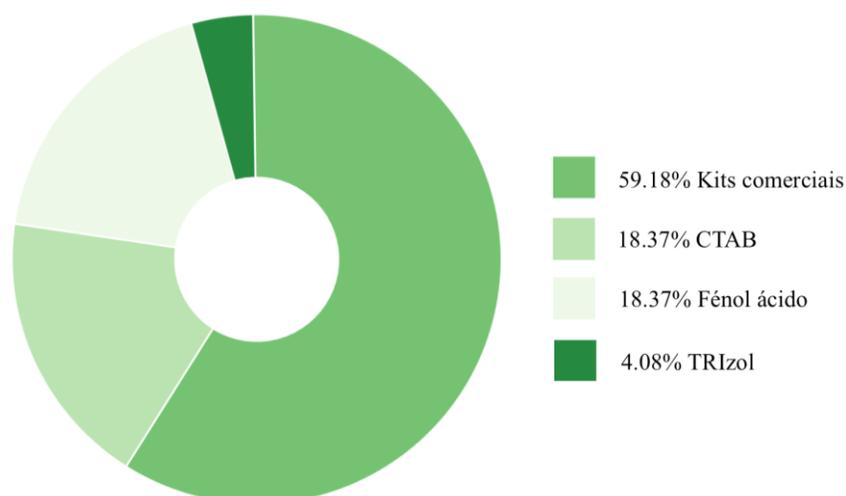


Fig. 2: Principais métodos de extração de RNA utilizados em estudos de expressão gênica em mandioca, com base em pesquisa nas bases de dados *Web of Science* e *Scopus*, em 10 de abril de 2024, abrangendo o período de abril de 2024 até setembro de 2024.

3.2 - Quantidade e pureza do RNA

Os dados das extrações realizadas mostram os resultados de diferentes métodos de extração de RNA de tecidos de mandioca, com a quantidade ($\text{ng}/\mu\text{L}$) e a pureza do RNA determinadas pelas razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} (Tabela 2). Para realizar a etapa subsequente de um estudo de expressão gênica via RT-qPCR, é necessário obter pelo menos 5000 ng de RNA que serão utilizados no tratamento com RNase para eliminar o DNA residual. Como todas as amostras foram ressuspensas em 20 μL , isso significa que as amostras devem ter uma concentração mínima de 250 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para garantir a quantidade necessária de RNA. Já a razão A_{260}/A_{280} é utilizada para avaliar a contaminação por proteínas, enquanto a razão A_{260}/A_{230} é usada para avaliar a presença de contaminantes como polissacarídeos e polifenóis, que são comuns em amostras de RNA de plantas. (MORET et al, 2013) Em geral, as razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} são recomendadas para estarem na faixa de 1,8 a 2,2, indicando amostras com baixo nível de contaminantes e adequadas para análises subsequentes. (LOGEMANN; SCHELL; WILLMITZER, 1987; MANNING, 1991).

Tabela 2: Comparação da qualidade do RNA isolado de tecidos de mandioca utilizando diferentes métodos de extração: CTAB com isopropanol na etapa de precipitação (CTAB + Isopropanol), CTAB com cloreto de lítio na etapa de precipitação, (CTAB + Cloreto de lítio), TRIzol e Fenol ácido. São apresentadas as quantidades de RNA obtidas, além das relações e A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} de Pureza, com seus erros-padrão, calculados a partir de quatro repetições biológicas.

Métodos de extração	Tecidos	Quantidade (ng/μL)	Pureza A_{260}/A_{280}	Pureza A_{260}/A_{230}
CTAB + Isopropanol	Raízes	644,48 \pm 183,13	2,10 \pm 0,04	1,61 \pm 0,16
	Caule	616,75 \pm 174,90	2,03 \pm 0,03	2,22 \pm 0,07
	Folhas	847,63 \pm 84,42	2,10 \pm 0,04	1,58 \pm 0,04
CTAB + Cloreto de lítio	Raízes	366,48 \pm 161,5	2,16 \pm 2,07	2,26 \pm 2,47
	Caule	302,6 \pm 137,90	2,03 \pm 2,05	2,12 \pm 2,10
	Folhas	1928 \pm 134,42	2,14 \pm 2,08	2,27 \pm 2,04
Fenol ácido	Raízes	334,40 \pm 105,51	1,97 \pm 0,02	2,14 \pm 0,08
	Caule	483,25 \pm 210,26	1,47 \pm 0,07	0,61 \pm 0,05
	Folhas	927,18 \pm 280,32	0,91 \pm 0,06	0,21 \pm 0,06
TRIzol	Raízes	1563,93 \pm 854,49	1,92 \pm 0,11	26,88 \pm 6,14
	Caule	104,03 \pm 86,18	0,92 \pm 0,08	0,17 \pm 0,04
	Folhas	459,93 \pm 282,6	0,90 \pm 0,06	0,20 \pm 0,05

Todos os métodos de extração avaliados permitiram a obtenção de RNA em quantidade e qualidade suficientes para o desenvolvimento de estudos transcriptômicos da espécie, em pelo menos um dos tecidos analisados, com exceção do método TRIzol. Ao analisar o método CTAB usando isopropanol na etapa de precipitação (CTAB + Isopropanol), observou-se que ele gerou boas quantidades de RNA em todos os tecidos: raízes (644,48 \pm 183,13 ng/ μ L), caules (616,75 \pm 174,90 ng/ μ L) e folhas (847,63 \pm 84,42 ng/ μ L). Os valores da razão A_{260}/A_{280} estavam dentro da faixa adequada, refletindo um bom equilíbrio entre proteínas e ácidos nucleicos. No entanto, a razão A_{260}/A_{230} das raízes (1,61 \pm 0,16) e folhas (1,58 \pm 0,04) ficou ligeiramente abaixo da faixa recomendada,

sugerindo a presença de polissacarídeos e polifenóis. Já o caule apresentou uma excelente razão A260/A230 ($2,22 \pm 0,07$), indicando amostras de RNA com boa pureza.

O método CTAB, utilizando cloreto de lítio na etapa de precipitação do RNA (CTAB + Cloreto de Lítio), resultou em menores quantidades de RNA nas raízes ($366,48 \pm 161,5$ ng/ μ L) e nos caules ($302,6 \pm 137,90$ ng/ μ L), mas as quantidades ainda foram suficientes para o desenvolvimento de estudos transcriptômicos. Em contraste, as folhas apresentaram a maior quantidade de RNA entre todos os métodos avaliados ($1928 \pm 134,42$ ng/ μ L). Quanto à pureza, as razões A260/A280 e A260/A230 demonstraram valores adequados, indicando uma boa relação entre ácidos nucleicos e contaminantes, sugerindo que o método é eficaz na extração de RNA puro dos tecidos avaliados.

O método Fenol ácido demonstrou eficiência variável. Embora tenha proporcionado quantidades satisfatórias de RNA nas raízes ($334,40 \pm 105,51$ ng/ μ L), caules ($483,25 \pm 210,26$ ng/ μ L) e folhas ($927,18 \pm 280,32$ ng/ μ L), a pureza adequada foi observada apenas nas amostras de raízes, com razões A260/A280 ($1,97 \pm 0,02$) e A260/A230 ($2,14 \pm 0,08$) dentro da faixa recomendada para amostras com baixo nível de contaminantes.

Por fim, o método TRIzol apresentou a maior quantidade de RNA nas raízes ($1563,93 \pm 854,49$ ng/ μ L), mas a pureza foi significativamente afetada, com elevados valores da razão A260/A230 nas raízes ($26,88 \pm 6,14$), indicando a presença de contaminantes. A pureza do RNA extraído das folhas e dos caules também foi inferior, com baixos valores da razão A260/A230, sugerindo que o TRIzol pode não ser o método ideal para esses tecidos.

3.3 - Integridade do RNA

A análise da integridade do RNA extraído por diferentes métodos foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com Sybr Safe (Figura 3). Os perfis eletroforéticos revelaram diferenças na qualidade das amostras, evidenciando a eficiência de cada protocolo de extração.

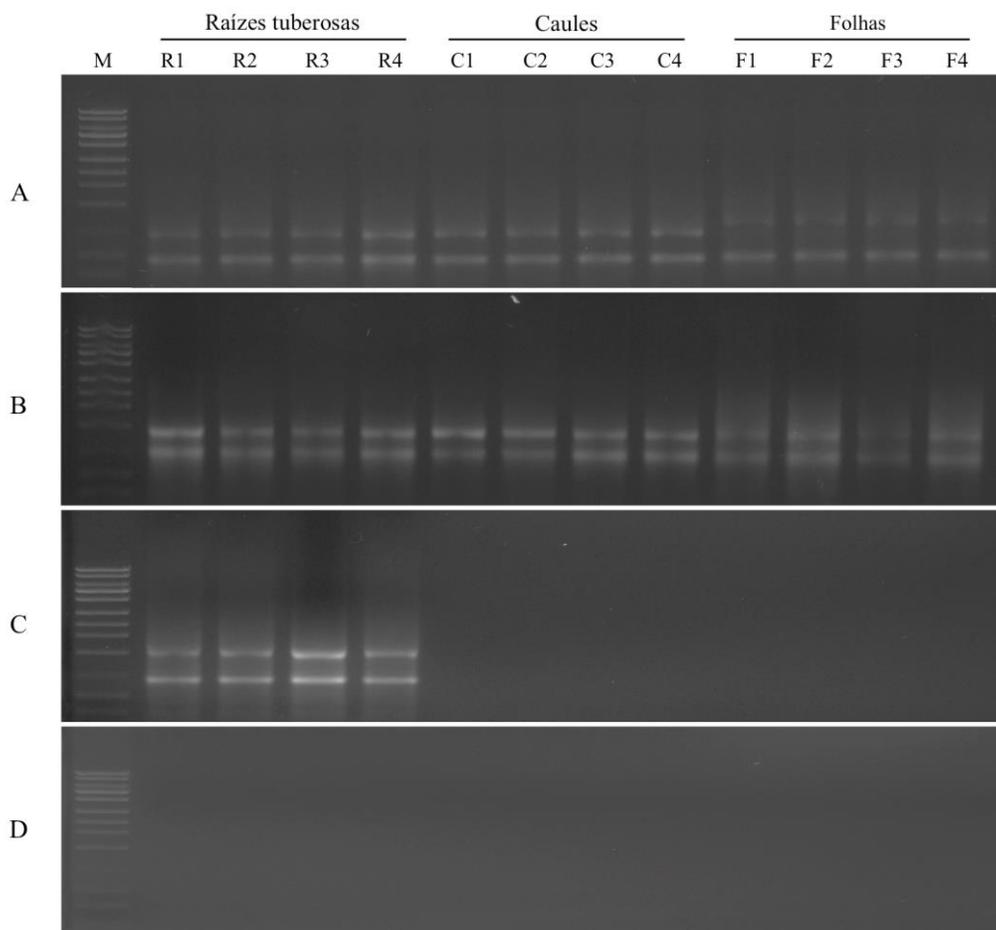


Fig. 3: Análise de integridade do RNA extraído de diferentes tecidos (raízes tuberosas, caules e folhas) de mandioca pelos métodos CTAB + Isopropanol (A), CTAB + Cloreto de lítio (B), Fenol Ácido (C) e TRIzol (D). Os géis de agarose (1,0%) foram corados com *Sybr Safe*. M – Marcador de peso molecular de 1 Kb. As letras R, C e F, referem-se, respectivamente, aos tecidos de raízes tuberosas, caules e folhas. Os números após a indicação do tecido representam cada repetição biológica.

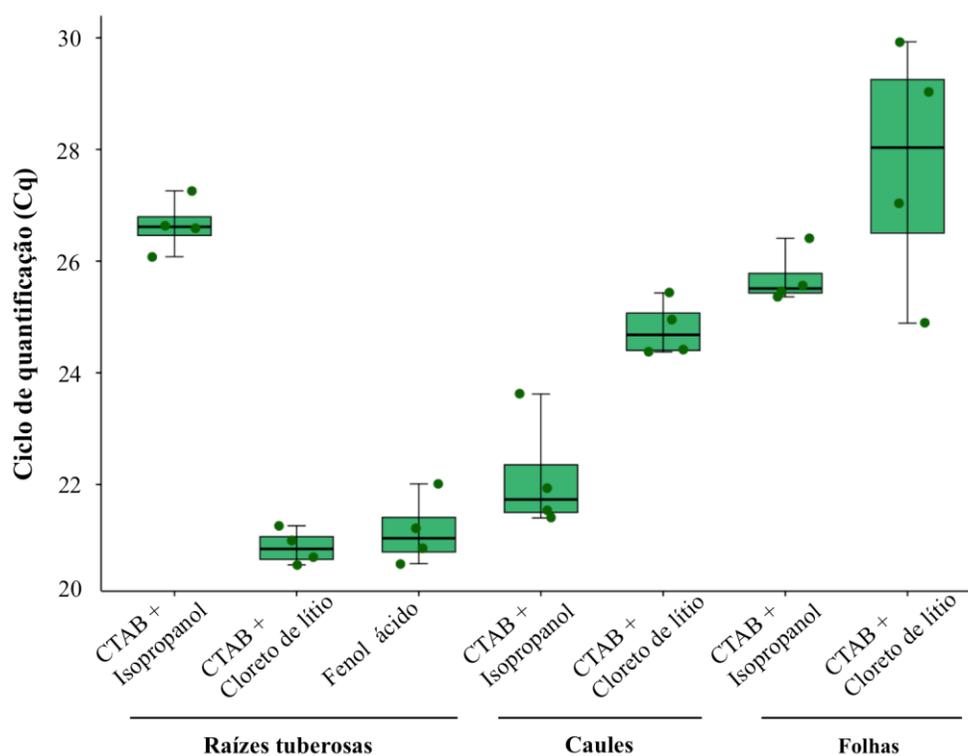
As amostras extraídas pelos métodos CTAB + Isopropanol e CTAB + Cloreto de Lítio (Géis A e B) apresentaram bandas bem definidas correspondentes aos rRNAs 28S e 18S, indicando uma extração eficiente para todos os tecidos analisados (raízes tuberosas, caules e folhas). Por outro lado, o método de Fenol ácido (Fig. 3C) exibiu variações na integridade do RNA, com bandas nítidas das subunidades ribossomais observadas apenas nas amostras de raízes tuberosas. Para os tecidos de caule e folha, o RNA apresentou degradação completa, sugerindo que esse protocolo pode não ser adequado para esses tipos de amostras.

Por fim, as amostras extraídas pelo método TRIzol (Fig. 3D) apresentaram degradação significativa do RNA, possivelmente devido à presença de contaminantes residuais, conforme indicado pela análise de pureza (Tabela 2).

Em conjunto, os resultados demonstram que os métodos baseados em CTAB proporcionam maior integridade do RNA em comparação aos demais protocolos testados. O método TRIzol apresentou o maior grau de degradação, enquanto o protocolo de Fenol ácido resultou em RNA de qualidade satisfatória apenas para raízes tuberosas. Esses achados reforçam a importância da escolha criteriosa do método de extração de RNA, considerando as características específicas de cada tecido e as condições experimentais de cada estudo.

3.4 - RT- qPCR: Análise dos valores de cqs e da expressão gênica

A eficiência dos métodos de extração de RNA variou entre os diferentes tecidos analisados, conforme demonstrado pelos valores de ciclo de quantificação (Cq) do gene-alvo Starch branching enzyme 1 (MeSBE-1), obtidos por PCR em Tempo Real (Figura 4). Devido à baixa qualidade do RNA observada nas análises de pureza e integridade (Tabela 2 e Figura 3), o método TRIzol não foi avaliado para nenhum dos tecidos via RT-qPCR, enquanto o método Fenol ácido foi testado apenas em raízes tuberosas.



Fonte: autor

Fig. 4: Níveis de expressão do gene-alvo *MeSBE-1* com base nos valores de Cq (Ciclo de quantificação) obtidos a partir das raízes tuberosas, caules e folhas de plantas de mandioca submetidas a diferentes métodos de extração de RNA: CTAB + Isopropanol, CTAB + cloreto de lítio e Fenol ácido. Os boxplots representam a distribuição da expressão gênica nos diferentes tecidos de mandioca a partir dos valores de Cq, sendo a linha central correspondente à mediana. Os valores de expressão foram obtidos a partir de quatro repetições biológicas.

Analisando cada tecido, observou-se que, para as raízes tuberosas, os métodos Fenol ácido (Cq médio de 21.17) e CTAB + Cloreto de lítio (Cq médio de 20.88) apresentaram um desempenho superior ao método CTAB + Isopropanol (Cq médio de 26.64). Esses resultados indicam que os dois primeiros métodos proporcionaram uma extração de RNA de maior qualidade, refletida nos menores valores de Cq do gene-alvo *MeSBE-1*.

Para caules e folhas, o método CTAB + Isopropanol apresentou valores médios de Cq ligeiramente menores (22.12 e 25.70, respectivamente) em comparação ao CTAB + Cloreto de lítio (24.79 e 27.72, respectivamente). Esses resultados sugerem que o CTAB + Isopropanol proporcionou uma extração de RNA mais eficiente nesses tecidos.

Como o método CTAB + Isopropanol, permitiu a obtenção dos menores valores de Cq para caules e folhas, essas amostras foram usadas como controle na avaliação do perfil de expressão relativa do gene *MeSBE-1* a partir da normalização dos dados pelos genes de referência *MeU35* e *MeTUB* (Figura 5)

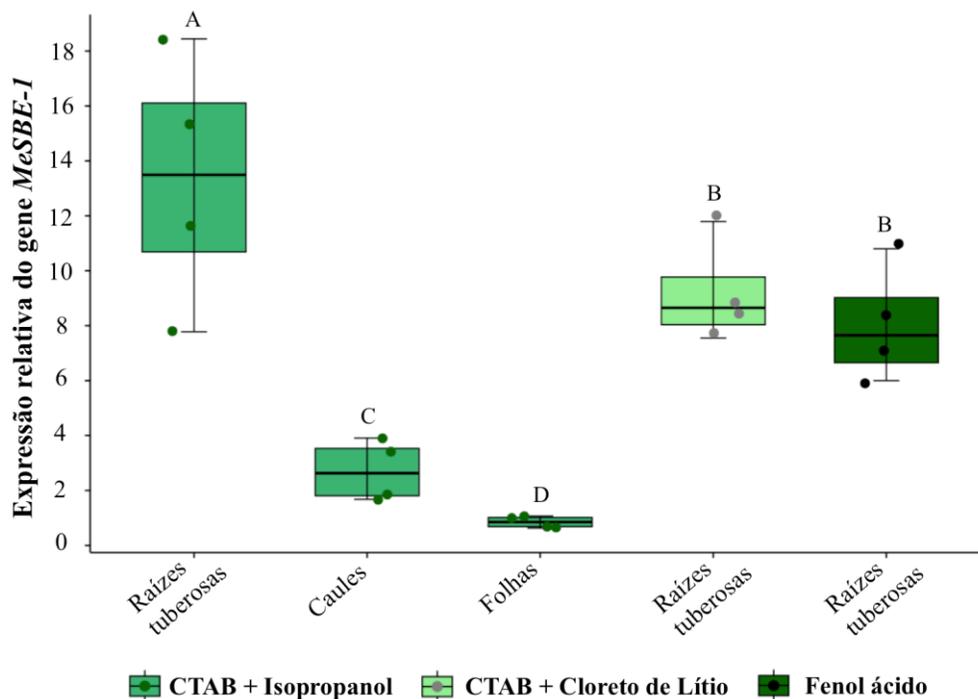


Fig. 5: Perfil de expressão relativa do gene *MeSBE-1* em diferentes tecidos (raízes tuberosas, caules e folhas) de mandioca (*Manihot esculenta*) utilizando o RNA extraído por três métodos (CTAB + Isopropanol, CTAB + Cloreto de lítio e Fenol ácido). Os boxplots representam a distribuição da expressão gênica nos diferentes tecidos de mandioca, onde a linha central indica a mediana. A normalização foi realizada em relação a uma amostra calibradora (repetição biológica I de folhas extraídas pelo método CTAB + Isopropanol). Para a quantificação relativa, os genes *MeU35* e *MeTUB* foram utilizados com genes de referência. Os valores de expressão foram obtidos a partir de quatro repetições biológicas. As médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si, segundo o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Os resultados demonstraram que a expressão relativa de *MeSBE-1* variou significativamente entre os diferentes tecidos e métodos de extração avaliados. A análise estatística revelou quatro grupos distintos de expressão. As raízes tuberosas extraídas com o método CTAB + isopropanol apresentaram os maiores valores de expressão relativa, seguidas pelas raízes tuberosas submetidas ao método CTAB + cloreto de lítio e fenol ácido. Em seguida, os caules extraídos com CTAB + isopropanol exibiram níveis intermediários de expressão, enquanto as folhas extraídas pelo mesmo método apresentaram os menores

valores. Essas diferenças estatísticas indicam que o método de extração e o tipo de tecido influenciam significativamente a expressão relativa do gene.

Além disso, o método CTAB + isopropanol resultou na maior variabilidade da expressão relativa de MeSBE-1 em raízes tuberosas, evidenciando uma dispersão mais ampla dos valores entre as repetições. Por outro lado, os métodos CTAB + cloreto de lítio e fenol ácido apresentaram menor variação nos valores de expressão, com médias mais uniformes e menor dispersão entre as repetições. Essa menor variabilidade sugere que esses métodos podem proporcionar maior reprodutibilidade nos experimentos de extração de RNA para a análise da expressão gênica.

4 – DISCUSSÃO

4.1 - Métodos de extração de RNA

O método CTAB é amplamente utilizado para a extração de ácidos nucleicos de amostras vegetais, incluindo as folhas de mandioca. A principal vantagem é sua eficácia na remoção de contaminantes, como compostos fenólicos e carboidratos, que frequentemente interferem na qualidade da extração de DNA. Além disso, o método é considerado econômico e acessível, o que o torna preferido, especialmente em estudos de larga escala ou em situações com recursos limitados. (MONGER, 2001)

Para a extração de RNA já existem na literatura alguns protocolos padronizados para diferentes espécies e tecidos (DAÚDE et al., 2023; GONÇALVES et al., 2021). O protocolo utilizando CTAB, por CHANG; PURYEAR; CAIRNEY, (1993), tem sido escolhido por ser eficiente, ter baixo custo e este método utiliza substâncias que reduzem compostos fenólicos e a precipitação realizada com cloreto de lítio, que retém substâncias proteicas, auxiliando na descontaminação das amostras (CHANG; PURYEAR; CAIRNEY, 1993).

Kits comerciais são projetados para fornecer resultados consistentes e reprodutíveis, minimizando as variações entre experimentos. Isso é crucial para a comparação de dados entre diferentes amostras ou experimentos. Simplifica o processo, sendo menos propenso a contaminação com outros ácidos nucleicos, proteínas ou compostos indesejados, como polifenóis ou polissacarídeos, que podem interferir na qualidade do RNA extraído tenha alta qualidade e integridade, com RNA livre de contaminantes que possam afetar análises

posteriores, como RT-qPCR ou RNA-seq (GONÇALVES et al., 2021).

Porém os kits podem ser mais onerosos, especialmente para projetos que exigem muitas amostras ou grandes volumes de RNA. Isso pode ser uma limitação significativa para laboratórios com orçamento restrito. Em geral o método menos dispendioso e que mantém a qualidade e quantidade de RNA são os protocolos que tiveram suas adaptações a partir do método de CTAB. (SOUZA et al., 2020). Em nossos resultados, demonstramos que para raiz, caule e folha de mandioca, o protocolo CTAB, de Chang et al. (1993), com modificações, utilizando-se isopropanol ou cloreto de lítio, obtiveram concentrações de RNA satisfatórias, e relações de pureza dentro da faixa ideal.

O método de extração de RNA utilizando Fenol ácido, apesar de não ter demonstrado um desempenho satisfatório de maneira geral, revelou-se funcional na obtenção de RNA de alta qualidade somente nas raízes de mandioca. Este resultado, muito provavelmente, justificam a preferência manifestada por alguns pesquisadores pelo uso do método com Ácido Fenol, especialmente quando o tecido de interesse para a extração compreende exclusivamente raízes tuberosas (CARVALHO et al., 2016; SIERRA et al., 2015).

O método de extração com Trizol se mostrou eficiente apenas em raiz, com altas concentrações de RNA, mas ineficaz nos tecidos, caule e folha. Com quantidades de RNA baixas e relações de pureza fora do padrão para todos os tecidos (Tabela 2).

A escolha por metodologias baseadas em Fenol e Trizol pode ser atribuída à eficácia comprovada desses métodos na obtenção de RNA de alta qualidade e pureza, o que proporciona resultados confiáveis para análises subsequentes (CALLEGARI et al., 2021; LI et al., 2021). Por outro lado, embora amplamente utilizados em diferentes contextos de pesquisa, muitos autores demonstram preferência significativa por abordagens que utilizam CTAB e Fenol Ácido para a extração de RNA (CALLEGARI et al., 2021; HERRERA et al., 2018; LI et al., 2021; MORGANTE et al., 2020; WAHYUNI et al., 2020). Essa tendência pode refletir a robustez e a eficiência desses métodos, bem como sua adequação às características específicas da planta estudada.

O protocolo Fenol ácido foi adaptado por Scherrer; Darnell (1962). Sendo o Fenol um composto orgânico que ao se misturar clorofórmio, atua nas amostras como agente desnaturantes de proteínas. A mistura de fenol e clorofórmio é muito eficiente para solubilizar a membrana plasmática. e sua ação se fundamenta na propriedade hidrofóbica das

proteínas que apresentam afinidade por solventes orgânicos (GUAN et al., 2019). O resultado, muito provavelmente, justifica a preferência manifestada por alguns pesquisadores pelo uso do método com Ácido Fenol, especialmente quando o tecido de interesse para a extração compreende exclusivamente raízes tuberosas (CARVALHO et al., 2016; SIERRA et al., 2015).

O protocolo TRI reagent® Sigma é composto pelo reagente Trizol, que é uma solução monofásica de fenol e guanidinaisotiocinato. Esse reagente mantém a integridade do RNA, e solubiliza seus componentes. A adição de clorofórmio seguida de centrifugação separa a solução em uma fase aquosa e outra fase orgânica, solubilizando os lipídeos e permitindo sua remoção (OLIVEIRA et al., 2016).

O RNA, pode ser obtido a partir de diversos tipos de tecidos vegetais, como folhas, raízes e caule, que em geral apresentam níveis elevados de compostos fenólicos, polissacarídeos e RNAses (JAAKOLA et al., 2001), o que dificulta o processo de extração com qualidade. A quantidade e qualidade de RNA são influenciadas por esses polissacarídeos, formando uma estrutura gelatinosa que precipita durante a extração (SHARMA; DING; DOKHOLYAN, 2008).

4.2 - Quantidade e pureza do RNA

O desafio de obter RNA de alta qualidade está, em parte, relacionado à necessidade de evitar a contaminação do RNA por polissacarídeos e polifenóis, substâncias presentes em diferentes concentrações dependendo do tecido e da espécie, que podem se ligar aos ácidos nucleicos, comprometendo sua qualidade e integridade (BADAI et al., 2020; BEHNAM et al., 2019). Dessa forma, esses parâmetros foram analisados neste estudo para identificar o método mais eficaz de isolamento de RNA de mandioca.

A quantidade de RNA normalmente utilizada para o tratamento com DNase em estudos transcricionais por meio da técnica de RT-qPCR é de 5 µg, sendo que 1 µg é então utilizado para a síntese de cDNA com essas quantidades variando conforme os métodos empregados. Dessa maneira, uma concentração mínima de 250 ng/µg é necessária em um volume de 20 µL. (conforme usamos neste estudo).

Grande quantidade de ribonucleases (RNAses), atrapalha a extração de RNA, compostos celulares altamente estáveis e ativos nos tecidos vegetais. Deste modo, a primeira

etapa em todos os protocolos de extração de RNA é a exposição deste material a tampões de extração. Segundo Sambrook & Russel 2001, esses materiais apresentam substâncias como o Cloreto de Lítio, reagente que atua na precipitação de RNA, e tiocianato e guanidina, reagente que mantém o RNA intacto para as etapas posteriores de extração.

Como o cloreto de lítio (LiCl) precipita preferencialmente RNA e não precipita tanto o DNA, o uso de LiCl pode reduzir a quantidade de contaminantes de DNA no RNA precipitado. Isso é especialmente importante em aplicações onde a integridade do RNA e a ausência de DNA são cruciais, como em experimentos de PCR ou análise de expressão gênica por qRT-PCR. (KOROLENYA et al., 2022).

Na literatura, em geral, são indicados valores de pureza (A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}) entre 1,8 e 2,2, já que amostras que estão entre esse intervalo são consideradas puras, ou seja, com pequenas quantidades de contaminantes que podem interferir na atividade da DNA polimerase (LOGEMANN; SCHELL; WILLMITZER, 1987; MANNING, 1991).

A espectrofotometria é uma técnica que permite medir a quantidade e a pureza do RNA de uma amostra. O seu funcionamento baseia-se na absorbância quando a amostra é exposta a uma certa faixa de luz ultravioleta. A capacidade de absorbância da luz ultravioleta do RNA é máxima a 260nm, com isso, os registros realizados nessa faixa indicam a quantidade de ácidos nucleicos. Já o aumento da absorbância a 280nm e 230nm indicam, respectivamente, a presença de proteínas e compostos fenólicos e sais (FARRELL, 2010). Portanto a relação A_{260}/A_{280} indica o nível de contaminação por proteínas e a relação A_{260}/A_{230} indica o nível de contaminação por compostos fenólicos na amostra (MORET et al., 2013).

No estudo de Mark, 2024 observou-se que a obtenção de DNA e RNA íntegros e de alta qualidade é essencial para garantir resultados precisos em sequenciamento e nas análises e aplicações subsequentes. E que as folhas de mandioca armazenadas por períodos mais prolongados apresentaram uma qualidade de DNA e RNA consideravelmente inferior em comparação com as folhas armazenadas por tempos mais curtos.

4.3 - Integridade do RNA

Os tecidos vegetais apresentam composição química diferentes, como teor de polissacarídeos e polifenóis por exemplo, o que torna o isolamento de ácidos nucleicos de

boa qualidade um desafio (BADAI et al., 2020), e impede que se tenha um método universal de isolamento. Muitos estudos já foram realizados em plantas, como batata-doce (GONÇALVES et al., 2021), citrus (HUMA et al., 2020), brócolis (SILES; EASTMOND; KURUP, 2020), mandioca (BEHNAM et al., 2019), feijão (ACOSTA-MASPONS; GONZÁLEZ-LEMES; COVARRUBIAS, 2019), dendê (LAKSANA; CHANPRAME, 2015) e café (HUDED; JINGADE; MISHRA, 2018) visando estabelecer o melhor protocolo para extração de RNA de qualidade.

A integridade do RNA pode ser avaliada por meio do uso de géis de agarose (AZIZI et al., 2017; MURGAN; KAZAKOVA; EFIMOVA, 2020). É fundamental no desenvolvimento de estudos transcricionais, pois a qualidade do RNA impacta diretamente a precisão e a confiabilidade dos resultados obtidos nas análises de expressão gênica. (MURGAN; KAZAKOVA; EFIMOVA, 2020).

O RNA degradado pode gerar fragmentos menores que podem ser amplificados de forma não específica, resultando em dados imprecisos durante a análise de expressão. Isso pode gerar artefatos, confundindo a interpretação dos resultados. (BADAI et al., 2020). Em estudos transcricionais que envolvem a síntese de cDNA a partir do RNA total, a qualidade do RNA é crucial. RNA de baixa qualidade pode levar à síntese de cDNA incompleto ou errôneo, comprometendo toda a análise posterior. A integridade do RNA assegura que as amostras analisadas sejam consistentes, o que é fundamental para garantir a reprodutibilidade dos resultados, especialmente em estudos que envolvem múltiplos replicados ou condições experimentais diversas. (GONÇALVES et al., 2021).

Quanto à qualidade e a integridade do RNA extraído, a síntese e eficiência de amplificação do cDNA e a escolha dos genes de referência são fatores cruciais que podem impactar fortemente os resultados dos estudos de expressão gênica por RT-qPCR. Portanto, para garantir a reprodutibilidade e minimizar a variabilidade dos ensaios de RT-qPCR, é crucial avaliar todos esses parâmetros. (DAUDE et al., 2024).

O RNA de alta qualidade, com integridade preservada, garante que as medições de expressão gênica por técnicas como RT-qPCR ou RNA-seq sejam precisas e representativas dos níveis reais de transcrição. O RNA degradado pode levar a resultados distorcidos, com a perda de informações sobre a expressão de certos genes. (AZIZI et al., 2017).

Quanto à utilização de LiCl para precipitação de RNA, ela oferece várias vantagens

em relação ao uso de isopropanol. Ambas as substâncias são eficazes para precipitar o RNA, mas cada uma tem características que podem ser mais ou menos vantajosas dependendo do contexto experimental. (KOROLENYA et al., 2022). O LiCl é mais específico para precipitar o RNA, enquanto o isopropanol pode precipitar tanto RNA quanto DNA. O cloreto de lítio tem uma alta afinidade pelo RNA, ajudando a evitar a precipitação de contaminantes como DNA, proteínas e outros componentes celulares. Isso é particularmente útil quando se deseja obter RNA de alta pureza. (KHAN et al., 2019)

Os resultados obtidos quando usamos o método CTAB corroboram, consistentemente, com as descobertas documentadas na revisão bibliográfica, a qual evidenciou o amplo uso desse método, seguido do método Fenol Ácido. Segundo Souza et al., (2021) o método CTAB tem uma notável presença na literatura científica, sendo amplamente adotado em uma gama de investigações voltadas para a extração de RNA a partir de uma diversidade de fontes, incluindo tecidos animais, vegetais, fungos, bactérias e até mesmo vírus.

4.4 - RT-qPCR: Análise dos valores de cqs e da expressão gênica

Quanto a análise da expressão gênica em plantas, temos a Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real quantitativa com transcrição reversa (RT-qPCR) como sendo um dos métodos mais comuns e amplamente utilizados devido à sua rapidez, alta sensibilidade, reprodutibilidade e precisão na determinação dos níveis de expressão gênica (PEI et al., 2015). Entretanto, é importante considerar que o uso de RT-qPCR para quantificação de RNA está sujeito a diversos fatores que podem influenciar diretamente os resultados obtidos nesta análise.

A RT-qPCR é uma técnica amplamente utilizada para a quantificação de ácidos nucleicos, especialmente em estudos de expressão gênica e diagnósticos moleculares. Um dos parâmetros dessa técnica é o Ciclo de Quantificação (Cq), também chamado de Ct (Threshold Cycle) ou Cp (Crossing Point), que representa o ciclo no qual a fluorescência do produto amplificado ultrapassa o limite de detecção estabelecido pelo equipamento (KOROLENYA et al., 2022).

A Interpretação dos Valores de Cq são inversamente proporcionais à quantidade inicial do RNA alvo na amostra. Ou seja, valores mais baixos indicam uma maior abundância

do alvo, enquanto valores mais altos sugerem uma menor concentração. A interpretação correta desses valores é essencial para garantir a precisão e a reprodutibilidade dos experimentos (KOROLENYA et al., 2022).

Em plantas superiores, o amido é a principal forma de carboidrato de armazenamento e é composto de amilose e amilopectina, que são polímeros de glicose. O amido é sintetizado por várias isoformas de várias enzimas. O gene alvo, SBE-1 (Starch braching enzyme 1) é responsável pela produção de enzimas de ramificação do amido (SBEs) que participam da biossíntese do amido e os mecanismos de regulação do amido. O gene codifica a enzima amido-ramificadora, que catalisa a formação de ramificações no amido (UTSUMI et al., 2022).

Os genes da família MeSBE, enzima de ramificação do amido, são fundamentais para a síntese de amilopectina, que determina em grande parte a estrutura e as propriedades físicas do amido (PEI et al., 2015). Os resultados descritos na literatura corroboram com os resultados obtidos no presente estudo quando os tecidos foram extraídos pelo método CTAB, pois o gene SBE-1 apresentou um elevado padrão de expressão em raiz tuberosa, uma expressão basal.

No entanto, existem desafios associados à técnica CTAB que devem ser considerados ao avaliar seu custo-benefício. Embora a extração de RNA com CTAB seja eficaz na remoção de lipídios e outros contaminantes, pode ser necessário realizar etapas adicionais de purificação, como a precipitação com isopropanol, para garantir que o RNA esteja livre de contaminantes como proteínas e fenóis. Essas etapas adicionais podem aumentar o tempo total de preparo das amostras. Além disso, a técnica CTAB pode não ser adequada para todos os tipos de amostras. Em tecidos ricos em polímeros ou com muita matéria lipídica, a eficiência da extração pode ser comprometida, exigindo ajustes no protocolo ou o uso de métodos alternativos. (MALIK et al., 2019).

O método de extração de RNA com CTAB é uma opção muito vantajosa em termos de custo-benefício, especialmente em laboratórios com orçamentos mais restritos. A sua flexibilidade, aliada a uma alta qualidade de RNA extraído quando bem executado, torna o método competitivo frente a alternativas comerciais mais caras. A literatura científica, como o estudo de Malik et al., (2019), fornece evidências que reforçam a eficácia e viabilidade econômica dessa técnica, destacando-a como uma alternativa eficaz para a extração de RNA

em uma variedade de contextos de pesquisa. No entanto, a adequação da técnica depende das características específicas da amostra, sendo importante avaliar as condições ideais para cada tipo de tecido ou organismo.

5 – CONCLUSÃO

O método de extração com CTAB possibilitou a obtenção de RNA de qualidade, com a precipitação do RNA com cloreto de lítio (LiCl), ao mesmo tempo em que disponibilizou uma quantidade suficiente de RNA para viabilizar análises moleculares subsequentes.

Os resultados obtidos neste estudo, darão base para novas pesquisas, no que diz respeito ao transcriptoma da mandioca, além de um maior conhecimento acerca do genoma funcional dessa espécie. Ademais, os resultados também podem gerar inovações tecnológicas de impacto, na cadeia produtiva de amiláceas, já que este trabalho permitirá estudos genéticos sobre a mandioca, os quais poderão ser usados no melhoramento de outras amiláceas.

6– REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-MASPONS, A.; GONZÁLEZ-LEMES, I.; COVARRUBIAS, A. A. Improved Protocol for Isolation of High-Quality Total RNA from Different Organs of *Phaseolus Vulgaris* L. **BioTechniques**, v. 66, n. 2, p. 96–98, 1 fev. 2019.

ALZATE, J. L. M.; TRAN, T.; CEBALLOS, H., NGUYEN, C. N. ET AL. Physicochemical characterization of special cassava starches and their application for bio-ethanol production through no-cook technology at very high gravity, **Industrial Crops and Products**, v. 219, 2024.

ANYANWU, C.N.; IBETO, S.L. EZEHOA, N.J. OGBUAGU. Sustainability of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) as industrial feedstock, energy and food crop in Nigeria, **Renewable Energy**, v. 81, 745-752, 2015.

AZIZI, P. et al. Evaluation of RNA extraction methods in rice and their application in expression analysis of resistance genes against *Magnaporthe oryzae*. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 31, n. 1, p. 75–84, 2 jan. 2017.

BADAI, S. S. et al. A rapid RNA extraction method from oil palm tissues suitable for reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR). **3 Biotech**, v. 10, n. 12, p. 530, 2020.

BEHNAM, B. et al. An optimized isolation protocol yields high-quality RNA from cassava tissues (*Manihot esculenta* Crantz). **FEBS Open Bio**, v. 9, n. 4, p. 814–825, 1 abr. 2019.

BUSTIN, S. A. et al. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 597–601, 2005.

CALLEGARI, D. M. et al. Changes in transcript levels of cassava superoxide dismutase and catalase during interaction with *Phytophthora* sp. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 114, 1 abr. 2021.

CARVALHO, L. J. C. B. et al. Natural variation in expression of genes associated with carotenoid biosynthesis and accumulation in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) storage root. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 133, 2016.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 11, n. 2, p. 113–116, 1993.

CHARLES, O. A review of drought-stress responsive genes and their applications for drought stress tolerance in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Discov Biotechnol** v.1, 5 2024.

DAÚDE, M. M. et al. Selection and validation of reference genes for RT-qPCR gene expression studies in *Candida viswanathii* cultivated under different grown conditions. **Journal of Microbiological Methods**, v. 211, 1 ago. 2023.

DAUDE, M. M. et al. Reference genes for Eucalyptus spp. under Beauveria bassiana inoculation and subsequently infestation by the galling wasp Leptocybe invasa. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, 1 dez. 2024.

DE SOUZA, M. R. et al. Comparative assessment of three RNA extraction methods for obtaining high-quality RNA from Candida viswanathii biomass. **Journal of Microbiological Methods**, v. 184, p. 106200, 2021.

DEVI, B.; KUMAR, M. N.; CHUTIA, M. BHATTACHARYYA, N. Abiotic and biotic stress challenges of Cassava in changing climate and strategies to overcome: A review. **Scientia Horticulturae**, v. 305, 2022

FAO. **Crops and livestock products**. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>>. Acesso em: 6 out. 2024.

FARRELL, R. E. Chapter 6 - Quality Control for RNA Preparations. Em: FARRELL, R. E. (Ed.). **RNA Methodologies (Fourth Edition)**. San Diego: Academic Press, 2010. p. 139–154.

FATHANAH, U. R., LUBIS, NASUTION, F.; MASYAWI, M.S. Characterization of bioplastic based from cassava crisp home industrial waste incorporated with chitosan and liquid smoke. IOP Conf. Ser.: **Materials Science and Engineering**, 334, 2018.

FREITAS, N. C. et al. Validation of reference genes for qPCR analysis of Coffea arabica L. somatic embryogenesis-related tissues. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128, n. 3, p. 663–678, 1 mar. 2017.

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.

GUAN, L. et al. An optimized method to obtain high-quality RNA from cassava storage root. **3 Biotech**, v. 9, n. 4, 1 abr. 2019.

HERRERA, M. et al. Studying the expression of genes coding for putative PR proteins in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Acta Biologica Colombiana**, v. 23, n. 3, p. 242–252, 1 set. 2018.

HUDED, A. K. C.; JINGADE, P.; MISHRA, M. K. A rapid and efficient SDS-based RNA isolation protocol from different tissues of coffee. **3 Biotech**, v. 8, n. 3, p. 183, 2018.

HUMA, N. et al. RNA isolation efficacy of commercial and modified conventional methods for Citrus tristeza virus and mRNA internal control amplification. **Biologia**, v. 75, n. 8, p. 1195–1202, 2020.

IMMANUEL, S.; JAGANATHAN, D.P., PRAKASH., SETHURAMAN, S. Cassava for Food Security, Poverty Reduction and Climate Resilience: A Review Manuscript Number:

4191 NAAS Rating: Indian Journal of Ecology, 2024.

JAAKOLA, L. et al. Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit. **Molecular Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 201–203, 2001.

KHAN, J. M. et al. Effect of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) on the conformation of a hen egg white lysozyme: A spectroscopic and molecular docking study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 219, p. 313–318, 2019.

KOROLENYA, V. A. et al. Evaluation of Advantages of Lithium Chloride as a Precipitating Agent in RNA Isolation from Frozen Vein Segments. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 173, n. 3, p. 384–389, 2022.

LAKSANA, C.; CHANPRAME, S. A simple and rapid method for RNA extraction from young and mature leaves of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). 2015.

LI, S. et al. Genome-wide analysis of tubulin gene family in cassava and expression of family member FtsZ2-1 during various stress. **Plants**, v. 10, n. 4, 1 abr. 2021.

LOGEMANN, J.; SCHELL, J.; WILLMITZER, L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 163, n. 1, p. 16–20, 1987.

LUCHO, S. R. et al. Validation of reference genes for RT-qPCR studies in *Stevia rebaudiana* in response to elicitor agents. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 24, n. 5, p. 767–779, 2018.

MAGAR, M. M.; LIU, H.; YAN, G. Genome-Wide Analysis of AP2/ERF Superfamily Genes in Contrasting Wheat Genotypes Reveals Heat Stress-Related Candidate Genes. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 2022.

MALIK, P. et al. Green silver nanoparticle and Tween-20 modulated pro-oxidant to antioxidant curcumin transformation in aqueous CTAB stabilized peanut oil emulsions. **Journal of Molecular Liquids**, v. 291, p. 111252, 2019.

MANNING, K. Isolation of nucleic acids from plants by differential solvent precipitation. **Analytical Biochemistry**, v. 195, n. 1, p. 45–50, 1991.

MARK, D. et al Assessing the effect of sample storage time on viral detection using a rapid and cost-effective CTAB-based extraction method. **Plant Methods**. 20, 64. 2024.

MORET, I. et al. Assessing an Improved Protocol for Plasma microRNA Extraction. **PLOS ONE**, v. 8, n. 12, p. e82753-, 23 dez. 2013.

MORGANTE, C. V. et al. Genetic and physiological analysis of early drought response in *Manihot esculenta* and its wild relative. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 42, n. 2, 1 fev. 2020.

MONGER W, et al. Identificação de diferentes isolados do vírus da faixa marrom de mandioca e desenvolvimento de um teste de diagnóstico. **Planta Pathology**;50(6):768–775. 2001.

MURGAN, O.; KAZAKOVA, A.; EFIMOVA, M. Comparison of methods for RNA extraction from potato plants for real-time PCR. **Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya**, p. 123–140, 1 jan. 2020.

OLIVEIRA, H. et al. protocolos de extração de rna e atividade enzimática em sementes de pimenta (*Capsicum chinense*). **Revista de Agricultura**, v. 91, n. 3, p. 285–299, 2016.

OTEKUNRIN, O. A. Cassava (*Manihot esculenta* Crantz): a global scientific footprint—production, trade, and bibliometric insights. **Discover Agriculture** 2, 94, 2024.

PEI, J. et al. Phylogeny and expression pattern of starch branching enzyme family genes in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) under diverse environments. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 406, n. 1, p. 273–284, 2015.

PFAFFL, M. W. **Quantification strategies in real-time PCR**. [s.l: s.n.].

SALCEDO, A.; ZAMBRANA, C.; SIRITUNGA, D. Comparative Expression Analysis of Reference Genes in Field-Grown Cassava. **Tropical Plant Biology**, v. 7, n. 2, p. 53–64, 2014.

SCHERRER, K.; DARNELL, J. E. Sedimentation characteristics of rapidly labelled RNA from HeLa cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 7, n. 6, p. 486–490, 1962.

SHARMA, S.; DING, F.; DOKHOLYAN, N. V. iFoldRNA: three-dimensional RNA structure prediction and folding. **Bioinformatics**, v. 24, n. 17, p. 1951–1952, 1 set. 2008.

SIERRA, S. C. et al. evaluación de la expresión de genes implicados en la biosíntesis de almidón en diferentes variedades de yuca. **Acta Biológica Colombiana**, v. 20, p. 37–46, 2015.

SILES, L.; EASTMOND, P.; KURUP, S. Big data from small tissues: extraction of high-quality RNA for RNA-sequencing from different oilseed Brassica seed tissues during seed development. **Plant Methods**, v. 16, n. 1, p. 80, 2020.

SIVAN, S.; SENTHILKUMAR, S.; MUTHUSAMY, S.; SENTHILKUMAR, K.; MUTHUSAMY, S.; SHEELA, M. N. ET AL. Genome analysis, identification, and expression analysis of nitrogen and potassium responsive genes in cassava. **Acta Physiologiae Plantarum** 47(4), 2025.

SOUZA, M. R. DE et al. Comparação de métodos de extração de RNA aplicados a culturas amiláceas utilizadas na produção de etanol: uma revisão bibliográfica. **Revista Desafios**, v. 7, n. 3, p. 134–144, 2020.

TIZE I, FOTSO AK, NUKENINE EN, MASSO C, NGOME FA, SUH C, LENDZEMO VW, NCHOUTNJI I, MANGA G, PARKES E, KULAKOW P, KOUEBOU C, FIABOE KKM, HANNA R. **New cassava germplasm for food and nutritional security in Central Africa.** *Sci Rep.* 1;11(1):7394. 2021

UTSUMI, Y. et al. Suppressed expression of starch branching enzyme 1 and 2 increases resistant starch and amylose content and modifies amylopectin structure in cassava. **Plant Molecular Biology**, v. 108, n. 4–5, p. 413–427, 1 mar. 2022.

ZHANG, XL., HUANG, XL., LI, J. ET AL. Evaluation of the RNA extraction methods in different Ginkgo biloba L. tissues. **Biologia** 76, 2393–2402, 2021.

WAHYUNI, Y. et al. **Variation in transcriptional profiles of carotenoid biosynthetic genes in Indonesian yellow- and white-fleshed tuberous root cassava (*Manihot esculenta* Crantz) accessions.** IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. **Anais...**Institute of Physics Publishing, 21 fev. 2020.

WAKASA, Y. Total RNA Extraction from Starchy Rice Endosperm. In: Kawakatsu, T. (eds) Rice. **Methods in Molecular Biology**, vol 2869, 2025.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Descrição de todas as etapas do protocolo e das alterações realizadas para a extração de RNA dos tecidos de mandioca.

Método CTAB com precipitação utilizando isopropanol:

A extração do RNA pelo método CTAB para raiz, caule e folha de mandioca foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Chang; Puryear e Cairney (1993), adaptado para microtubos e com pequenas modificações. (GONÇALVES, 2021; DAÚDE, 2023)

1° etapa: adicionar 525 µL do tampão de extração [2% (p/v) CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), 2% (p/v) PVP, 100 mM de Tris-HCL, 25 mM de EDTA, 20 mM de NaCl], 525 µL de TES (10 Mm de TRIS-HCL Ph 7,5, 10 mM de EDTA e 0,5% SDS) e 250 µL de β-mercaptoetanol para cada 100 ng de tecido vegetal;

2° etapa: incubar por 1 hora a 60°C em estufa à seco (exceto para as amostras de folhas) sendo homogeneizadas a cada 10 min.

3° etapa: adicionar 450 µl de clorofórmio à amostra, que foi homogeneizada em vórtex.

4° etapa: centrifugar a 14.000 rpm por 10 min a 4 °C.

5° etapa: transferir 600 µl para novos tubos Eppendorf.

6° etapa: adicionar 600 µl de clorofórmio.

7° etapa: homogeneizadas por vórtex e centrifugadas novamente por a 14.000 rpm por 10 min a 4°C.

8° etapa: transferir 250 µl da fase aquosa superior de dois tubos de mesma repetição (totalizando 500 µl de amostra) para novos tubos

9° etapa: adicionar 500 µL de isopropanol. seguido por uma incubação de 60 min a -20 °C.

10° etapa: centrifugar por 30 min/ 4 °C/13.800 rpm.

11° etapa: descartar sobrenadante e adicionar 800 µl de etanol 75% gelado nas amostras e centrifugado por 8 min /4 °C/13.800 rpm.

12° etapa: descartar etanol e secar os pellets de RNA na estufa em 8 minutos a 37°C.

13° etapa: ressuspender os pellets em 20 µL de água livre de nucleases. As amostras foram então armazenadas a -80 °C.

Método CTAB com precipitação utilizando cloreto de lítio:

1° etapa: adicionar 900 μL do tampão de extração [2% (p/v) CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), 2% (p/v) PVP, 100 mM de Tris-HCL, 25 mM de EDTA, 20 mM de NaCl] e 100 μL de β -mercaptoetanol para cada 100 ng de tecido vegetal;

2° etapa: homogeneizar as amostras em vórtex (45s) e incubar por 20 minutos a 65 °C (banho maria), com homogeneização das amostras a cada 10 minutos;

3° etapa: adicionar aos mesmos tubos da etapa 1, 800 μL de clorofórmio e homogeneizar em vórtex (45s);

4° etapa: centrifugar por 10 min a 4 °C em 14.000 RPM;

5° etapa: transferir 600 μL de sobrenadante para um novo tubo eppendorf (2 mL). Adicionar 600 μL de clorofórmio e homogeneizar em vórtex (45s);

6° etapa: centrifugar por 10 min a 4 °C em 14.000 RPM;

7° etapa: transferir 400 μl da fase aquosa superior para novos tubos

8° etapa: adicionar 83 μL de cloreto de lítio a 12M (LiCl),

9° etapa: incubar de 60 min a -20 °C.

10° etapa: centrifugar por 30 min/4 °C/14.000 rpm.

11° etapa: descartar sobrenadante ficando somente o pellet de RNA,

12° etapa: adicionar 1 ml de cloreto de lítio a 2,5M (LiCl), centrifugando novamente por 15 min/4 °C/14.000 rpm.

13° etapa: adicionar 1000 μl de etanol 75% gelado nas amostras e centrifugar por 10 min /4 °C/14000 rpm.

14° etapa: descartar etanol, os pellets de RNA secos por aproximadamente 8 min em forno a 37° C.

15° etapa: ressuspender pellets em 20 μL de água sem nuclease. As amostras foram então armazenadas a -80 ° C.

Método trizol:

A extração de RNA com o método TRIzol foi realizada seguindo as recomendações do manual do fabricante (Thermo Fisher Scientific/Invitrogen™).

1° etapa: 160 mg de material, macerado em nitrogênio líquido, foi adicionado a cada microtubo.

2° etapa: Adicionou-se 1000 µl de TRIzol aos tubos contendo o tecido vegetal e homogeneizou-se por vórtex. O tubo foi então mantido na vertical dentro da capela por 10 minutos.

3° etapa: Após isso, adicionou-se 200 µl de clorofórmio aos mesmos tubos e homogeneizou-se por vórtex.

4° etapa: Logo após, as amostras foram incubadas em gelo por 5 min.

1° etapa: Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 min a 4°C.

1° etapa: A fase aquosa (600 µl) foi transferida para um novo tubo, e 200 µL de clorofórmio foi adicionado, seguido de homogeneização por vórtex.

1° etapa: As amostras foram incubadas em gelo mais uma vez por 5 min e depois centrifugadas a 14.000 rpm por 15 min a 4°C.

1° etapa: O sobrenadante (300 µl) foi transferido para novos tubos. A precipitação do RNA foi realizada adicionando 250 µL de isopropanol para as amostras.

1° etapa: todas as amostras foram incubadas por 1 hora a -20 ° C.

1° etapa: As amostras foram então centrifugadas (30 min / 4 ° C / 14.000 rpm).

1° etapa: o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado, com 1000 µl de etanol 75% gelado, seguido de centrifugação (8 min / 4 ° C / 14.000 rpm).

1° etapa: O RNA foi ressuscitado em 20 µL de água livre de nuclease e as amostras foram então armazenadas a -80 ° C.

Método Fenol Ácido:

A extração do RNA com o Fenol Ácido (Thermo Fisher Scientific/Invitrogen™), foi realizada de acordo com o protocolo descrito por De Souza et al. (2021) com as seguintes modificações.

1° etapa: 160 mg de material, macerado em nitrogênio líquido, foi adicionado a cada microtubo. Adicionou-se 750 µl de Fenol Ácido aos tubos contendo o tecido vegetal e homogeneizou-se por vórtex.

2° etapa: adicionar 750 µl de TES (TRIS/EDTA/SDS) aos mesmos tubos, e homogeneizou-se por vórtex.

3° etapa: amostras foram incubadas em estufa a seco a 60° C por 1 hora, sendo homogeneizadas a cada 10 minutos. Logo após, foram incubadas em gelo por 5 minutos.

4° etapa: centrifugar a 14.000 rpm por 10 min a 4°C. A fase aquosa (600 µl) foi transferida para um novo tubo e 600 µL de Fenol Ácido foi adicionado, seguido de homogeneização por vórtex.

5° etapa: As amostras foram incubadas em gelo mais uma vez por 5 min e depois centrifugadas por 10 min/14.000 rpm/4°C.

6° etapa: O sobrenadante (500 µl) foi transferido para novos tubos e 500 µL de clorofórmio gelado foram adicionados, após homogeneização, as amostras foram centrifugadas (10 min / 4 ° C / 14.000 rpm). Após a centrifugação, 250 µl do sobrenadante foi transferido para novos tubos.

7° etapa: A precipitação do RNA foi realizada adicionando 250 µL de isopropanol para as amostras.

8° etapa: Em seguida, todas as amostras foram incubadas por 1 hora a -20 ° C.

9° etapa: As amostras foram então centrifugadas (30 min / 4 ° C / 14.000 rpm),

10° etapa: o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado, com 800 µl de etanol 75% gelado, seguido de centrifugação (8 min / 4 ° C / 14.000 rpm).

11° etapa: O RNA foi ressuscitado em 20 µL de água livre de nuclease e as amostras foram então armazenadas a -80 ° C.

12° ou 10° etapa: descartar a mistura (isopropanol + amostra) e adicionar 800 μ L de etanol (75%);

13° ou 11° etapa: centrifugar por 8 min a 4 °C em 14.000 RPM;

14° ou 12° etapa: descartar o etanol e deixar o pellet secar com a tampa aberta por 5 min a 37 °C;

15° ou 13° etapa: ressuspender o pellet em 20 μ L de H₂O comercial.

Tabela 4- Resultados da pesquisa no banco de dados WEB OF SCIENCE, SCOPUS por artigos relacionados a seleção dos protocolos de extração de RNA a serem avaliados na cultura da mandioca. utilizando as seguintes palavras-chave: “*gene expression*”, “*RNA extraction*”, “*RT-qPCR*” e “*cassava/Manihot esculenta*”,

Title	Year	Authors	Journal	Condition	Gene	Tissue	Reference gene	Protocol
Genome-wide identification, expression profiling, and functional analysis of ammonium transporter 2 (AMT2) gene family in cassava (<i>Manihot esculenta</i> crantz)	2023	Xiu et al.	Frontiers in plant science	-	AMT2	Raízes, caule, folhas	MeAMT2	kit Plant Total RNA Extraction (TIANGEN, China, DP437)
Genome-wide identification and expression of TIFY family in cassava (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	2022	Zheng et al.	Frontiers in plant science	-	TIFY	Raízes e folhas	EF1a	RNAprep Pure Kit
Genome-wide identification and expression analysis of ammonium transporter 1 (AMT1) gene family in cassava (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) and functional analysis of MeAMT1;1 in transgenic Arabidopsis	2022	Xia et al.	3 Biotech	Baixa concentração de Cloreto de Amônio (6, 12, 24, 48)	AMT1, AMT2	Raízes, caule e folhas.	ACT	RNAplant Plus Reagent
MeSPL9 attenuates drought resistance by regulating JA signaling and protectant metabolite contents in cassava	2022	Li et al.	Theoretical and Applied Genetics	Frio e seca	SPL9	Folhas	ACT	CTAB
Suppressed expression of starch branching enzyme 1 and 2 increases resistant starch and	2022	Utsumi et al.	Plant molecular biology	-	SBE1, SBE2a, SBE2b, SBE2c, SBE3	Raiz tuberosa e folhas	EF1a	Plant RNA Reagent (Thermo Fisher, Waltham, USA)

amylose content and modifies amylopectin structure in cassava								
Genome-Wide Analysis of Tubulin Gene Family in Cassava and Expression of Family Member FtsZ2-1 during Various Stress	2021	Li et al.	Plants	Hormônios: AIA, GA3, ABA, MeJA; Estresse abiótico: salino e seca	TUB1, TUB2, ..., até TUB23	Folhas	FtsZ2-1	Trizol Reagent (Invitrogen #15596026)
Changes in transcript levels of cassava superoxide dismutase and catalase during interaction with <i>Phytophthora</i> sp.	2021	Callegari et al.	Physiological and Molecular Plant Pathology	Infecção por <i>Phytophthora</i> sp.	SOD, CAT	Raízes inoculadas e Raízes não inoculadas	TUB	Fenol ácido :cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1)
Resistance and susceptibility to <i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>manihotis</i> in cassava: A transcriptomic comparison (or two sides of the same coin)	2020	Ramirez et al.	Physiological and Molecular Plant Pathology	-	PDDEXK-like, DSPP, NPF	Folhas	CCCH zinc finger protein	Invitrap® Spin plant RNA minikit (STRATEC, Berlín, GER)
Genetic and physiological analysis of early drought response in <i>Manihot esculenta</i> and its wild relative	2020	Morgante et al.	Acta Physiologiae Plantarum	Estresse de seca	MsClpB1, MsHSP70, MsHSP17.6a, MsHSP17.6b, MsHSP23.5-MITO, MsAGL11, MsZf-C2H2.	Folhas	G3PDH, ACT	CTAB
Variation in transcriptional profiles of carotenoid biosynthetic genes in Indonesian yellow- and white-fleshed tuberous root cassava (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) accessions	2020	Wahyuni et al.	IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science	-	PSY, CRTISO, LYCa, LYCb, BCH1	Raízes tuberosas	EF1a	CTAB
A Cassava CPRF-2-like bZIP Transcription Factor Showed Increased Transcript Levels during Light Treatment	2020	Pontes et al.	Protein & Peptide Letters	Exposição a luz	bZIP, CHS	Raízes e folhas	TUB	CTAB

Genome-wide identification of miRNAs targets involved in cold response in cassava	2020	Li et al.	Plant Omics Journal	Estresse de frio	SPL, MYB, ARF, NAC, HD-ZIP, AGO, SCL, AP2, TCP, TIR, AFB, F-box, APS, GRF	Folhas jovens e ápice caulinar	ACT e U6-snRNA	RNA Plant kit (OMEGA)
Agrobacterium-Mediated Gene Transient Overexpression and Tobacco Rattle Virus (TRV)-Based Gene Silencing in Cassava	2019	Zeng et al.	International journal of molecular sciences	-	GFP, GUS, PDS	Folhas	EF1a	RNAprep Pure Kit
Identification and expression of genes in response to cassava bacterial blight infection	2018	Tappiban et al.	Journal of Applied Genetics	-	BRI1, CNG, UPF1, ATG	Folhas	EF1a	CTAB
Estudio de la expresión de genes que codifican para putativas proteínas pr en yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	2018	Herrera et al.	Acta biológica colombiana	Infecção bacteriana	PR	Caule	HK2, TUB	Fenol ácido:Clorofórmio
Genome-Wide Identification, Expression, and Functional Analysis of the Sugar Transporter Gene Family in Cassava (<i>Manihot esculenta</i>)	2018	Liu et al.	International journal of molecular sciences	-	STP	Raíces	STP (30 dias de cresc. - raiz)	RNAplant Plus reagent (Tiangen, China)
Novel Bioengineered Cassava Expressing an Archaeal Starch Degradation System and a Bacterial ADP-Glucose Pyrophosphorylase for Starch Self-Digestibility and Yield Increase	2018	Ligaba-Osena et al.	Frontiers in plant science	-	α -amylase, amylopullulanase, <i>S. solfataricus</i> glucoamylase	Raíces tuberosas	TUB	Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma)
RAV transcription factors are essential for disease resistance against cassava bacterial blight via activation of melatonin biosynthesis genes	2017	Wei et al.	Journal of pineal research	-	RAV	Folhas	EF1a	AxyPrep™ Multisource Total RNA Miniprep Kit (AYXGEN-09113KD1, AYXGEN, Santa Clara, CA, USA)
Phylogeny and expression pattern analysis of TCP	2017	Lei et al.	scientific reports	Frio e seca	TCP	Folhas jovens	ACT	Plant RNA kit (OMEGA)

transcription factors in cassava seedlings exposed to cold and/or drought stress								
Expression patterns of members of the ethylene signaling-related gene families in response to dehydration stresses in cassava	2017	Ren et al.	PLOS ONE	Estresse de desidratação	ERF	Raízes, raízes tuberosas, caule e folhas	ACT	CTAB
Genome-wide characterization and expression profiling of HD-Zip gene family related to abiotic stress in cassava	2017	Ding et al.	PLOS ONE	Frio, salinidade, e ABA	HD-Zip	Raízes e folhas		RNA plant reagent kits (Tiangen Company, Beijing, China)
Molecular diversity analysis, drought related marker-traits association mapping and discovery of excellent alleles for 100-day old plants by EST-SSRs in cassava germplasms (<i>Manihot esculenta</i> Cranz)	2017	Wang et al.	PLOS ONE	Estresse de alagamento	Manes.02G009300, Manes.02G062400, Manes.02G124800, Manes.03G053400, Manes.03G182700, Manes.05G015700, Manes.05G026900, Manes.05G090000, Manes.06G045100, Manes.06G062400, Manes.07G029200, Manes.07G117400, Manes.08G095800, Manes.09G068800, Manes.10G078800, Manes.11G145300, Manes.12G005000, Manes.12G129800, Manes.13G013400, Manes.13G127100, Manes.15G011300, Manes.15G145900, Manes.15G163900, Manes.17G056100.	Raízes e folhas	ACT	RNAprep Pure Kit

Validation of Reference Genes for Relative Quantitative Gene Expression Studies in Cassava (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) by Using Quantitative Real-Time PCR	2016	Hu et al.	Frontiers in plant science	Estresse de seca	26 genes: TUB, PP2A, UBQ10, ACT, SAND, TIP41-like, AT4G26410.1 , AT4G33380.1 , CACS, PPR, EMP70, 26S proteasome, HDH, Acyl-CoA-Binding, AT1G10430.1, AT1G20270.1, AT1G43690.1, AT4G33890.1, AT3G62870.1, AT2G05840.1, AT3G48440.1, AT1G17880.1, AT5G66810.1, AT1G07540.1, AT2G47330.1	Raízes tuberosas, caule e folhas		RNAprep Pure Kit
Genome-Wide Identification and Expression Analysis of the WRKY Gene Family in Cassava	2016	Wei et al.	Frontiers in plant science	Estresse de seca	WRKY	Raízes tuberosas, caule e folhas	TUB, EF1a	RNeasy extraction kit (TIANGEN, China)
Molecular cloning, subcellular localization and characterization of two adenylate kinases from cassava, <i>Manihot esculenta</i> Crantz cv. KU50	2016	Boonrueng et al.	Journal of Plant Physiology	-	ADK1 e ADK2	Folhas e raízes	TUB	RNeasy® Plant Mini kit (Qiagen) e Concert Plant RNA Reagent (Invitrogen),
Natural variation in expression of genes associated with carotenoid biosynthesis and accumulation in cassava (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) storage root	2016	Carvalho et al.	BMC Plant Biology	-	PSY, PDS, CRTISO, BCH, LYCb, and NXS	Raízes tuberosas	18S	Phenol-chloroform

Faithful transmission and expression of transgenes via somatic embryos of transgenic cassava plants at the sixth cycle of vegetative propagation	2016	Opabode & Akinyemiju	Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology	-	GUS	Raízes primarias, Caule, peciolo e folhas		Qiagen Plant RNA Extraction Kit (Qiagen Inc.)
Cassava (<i>Manihot esculenta</i>) transcriptome analysis in response to infection by the fungus <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> using an oligonucleotide-DNA microarray	2016	Utsumi et al.	Journal of Plant Research	Infecção por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	PR	Folhas	EF1a	RNeasy Plant Mini kit (QIAGEN)
Factors influencing somatic embryogenesis, regeneration, and Agrobacterium-mediated transformation of cassava (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) cultivar TME14	2015	Nyaboga et al.	Frontiers in plant science	Produção de calos embriogênicos	gusA	Raízes, caule, folhas e calos	PP2A	RNeasy plant mini kit
Genome-Wide Identification, Expression, and Activity Analysis of Alkaline/Neutral Invertase Gene Family from Cassava (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	2015	Yao et al.	Plant molecular biology	-	nINV	Folhas e flores	b-TUB	RNAplant Plus reagent (TianGen, China)
Evaluación de la expresión de genes implicados en la biosíntesis de almidón en diferentes variedades de yuca	2015	Sierra et al.	ACTA BIOLÓGICA COLOMBIANA	-	Isoamilase, Pululanase, α -Amilase, AGPase, SBE, GBSS, SSS, DPE	Raízes tuberosas	TUB	fenol ácido (pH 4.3):cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1)
Gene expression of beta carotene genes in transgenic biofortified cassava	2015	Telengech et al.	3 Biotech	-	DXS, crtB and nptII	Raízes e folhas	GeneRuler ladder	Dellaporta protocol (1983)
Isolation and characterization of a C-repeat binding factor (CBF)-like gene in cassava (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	2014	Li et al.	Acta Physiologiae Plantarum	-	CBF-like	Raízes, caule, folhas	ACT	RNA plant plus reagent (TIANGEN) and TRIzol-Mate (TIANDZ)

Molecular cloning and characterization of a cassava translationally controlled tumor protein gene potentially related to salt stress response	2014	Brígida et al.	Molecular biology	Estresse de salinidade	TCTP	Folhas	TUB	Fenol:Clorofórmio
Physiological and molecular characterization of drought responses and identification of candidate tolerance genes in cassava	2013	Turyagyenda et al.	AOB plants	-	ZFP, ATTF, ALDH, MSD, GE3, GBF32, GF14, RD282, MYC2, VAP,	Folhas	ACT	Concert Plant RNA Reagent (catalogue number 12322-012; Invitrogen)
Molecular cloning and characterization of a novel RING zinc-finger protein gene up-regulated under in vitro salt stress in cassava	2012	Reis et al.	Mol Biol Rep	Estresse de salinidade in vitro	RZF	Raízes e folhas	TUB	Fenol:Clorofórmio e CTAB
Transcriptome profiling of low temperature treated cassava apical shoots showed dynamic responses of tropical plant to cold stress	2012	An et al.	BMC Genomics	estresse de frio	AP2, SSI2, ACD, MAPK4, PERK1, HSP18.2, BET-V-1, CHIT, MEE14, MLP31, MLP34, MLP423, JMT, KCS, CAT2, HSP17.4, TCH2, ERF2, MAPK9, RING-H2, GAI, GSTU19, UGT, MYB, CIPK25, ELF4, GA2ox8, UBE3, PRR5, SIGB, UBQ, ZN, Prx72, ATG18, LOC100359392, ABF3, CC-NBS-LRR	Brotos, raízes fibrosas, folhas maduras, caule maduro, folhas jovens e caules jovens	ACT	Plant RNA Reagent (Invitrogen, Cat.No.12322-02)
Levels of MeLEA3, a cDNA Sequence Coding for an Atypical	2011	Costa et al.	Plant molecular biology	Estresse de salinidade	LEA	Raízes e folhas	TUB	Fenol:Clorofórmio e CTAB

Late Embryogenesis Abundant Protein in Cassava, Increase Under In Vitro Salt Stress Treatment								
Reference genes for reliable potyvirus quantitation in cassava and analysis of Cassava brown streak virus load in host varieties	2011	Moreno et al.	Journal of Virological Methods	Infecção viral (Potyvirus)	PP2A, UBQ10, vATPs, GTPb, ClpA	Raízes, folhas e caule	PP2A, UBQ10, GTPb	CTAB
Molecular characterization of two genes encoding plastidic ATP/ADP transport proteins in cassava	2009	Yuen et al.	Biologia plantarum	-	AATP	Raízes fibrosas, raízes tuberosas, caule e folhas	EF1a	Fenol:Clorofórmio
Quantitative analysis of transgenes in cassava plants using real-time PCR technology	2009	Beltrán et al.	In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant	Cultura simbiótica (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)	GUSplus, hptII, G3pdh	Folhas	18S	SV 96 Total RNA Isolation System (Promega Corporation, Madison, WI)
Isolation and characterization of an alpha-amylase gene in cassava (<i>Manihot esculenta</i>)	2005	Tangphatsornruang et al.	Plant Physiology and Biochemistry	GA e BAP (hormônios)	amy2	Raízes tuberosas	ACT	phenol/chloroform-based extraction (modificado)
Molecular characterization of a cDNA encoding copper/zinc superoxide dismutase from cultured cells of <i>Manihot esculenta</i>	2005	Shin et al.	Plant Physiology and Biochemistry	In vitro + 2,4D + escuro	mSOD2	Cultura de células	ACT	LiCl method
Genomic Organization and Structure of α -Hydroxynitrile Lyase in Cassava (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	1998	Hughes et al.	Archives of biochemistry and biophysics	-	HNL	Folhas jovens	cas5, EF1a	Tri Reagent (Sigma) baseado no método de Chomezynski e Sacchi (1987)