

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II

AGRONOMIA

**MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL A PARTIR DE DIFERNTES  
TECIDOS DE *Caryocar brasiliense* CAMBESS**

IANINA MARIA DE MORAIS DEL RIO

Montes Claros, 2017

**Ianina Maria de Morais Del Rio**

**MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL A PARTIR DE DIFERNTES  
TECIDOS DE *Caryocar brasiliense* CAMBESS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto de Ciências  
Agrárias da Universidade Federal de  
Minas Gerais, como requisito parcial,  
para a obtenção do título de Bacharel em  
Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio  
Nascimento Lopes

Co-orientadora: Cristina de Paula Santos  
Martins

Montes Claros  
Instituto de Ciências Agrárias – UFMG

2017

Ianina Maria de Morais Del Rio  
**MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL A PARTIR DE DIFERNTES  
TECIDOS DE *Caryocar brasiliense* CAMBESS**

Aprovada pela banca examinadora constituída por:

Prof. Dr<sup>a</sup> Silvia Nietsche  
ICA/UFMG

Dr<sup>a</sup> Cristina de Paula Santos Martins - Pós-Doutoranda  
ICA/UFMG

Prof. Dr Dermerson Arruda Sanglard  
ICA/UFMG

---

Prof. Dr Paulo Sérgio Nascimento Lopes - Orientador ICA/UFMG

Montes Claros, Dezembro de 2017

Ao meu orientador Paulo Sérgio Nascimento Lopes pelos ensinamentos e paciência. À minha co-orientadora Cristina Santos Martins por incentivar-me e acreditar no meu potencial.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Paulo Sérgio Nascimento Lopes pelo suporte, correções e aprendizado. À pós-doutoranda Cristina de Paula Santos Martins que me incentivou do início ao fim, acreditou no meu potencial e me mostrou o melhor caminho a seguir. Aos meus colegas do GEFEN pelo tempo que compartilhamos juntos e por todo apoio. À UFMG, ao laboratório de Biotecnologia e à Unimontes que me forneceram ferramentas fundamentais para concretização desse projeto. À Fapemig e CNPq pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A extração de RNA qualitativa e quantitativamente é o primeiro passo para estudos de expressão gênica, incluindo transcriptase reversa (RT), PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), construção de bibliotecas de cDNA ou análises de *microarray*. Entretanto, a extração de RNA em qualidade e quantidade ideal a partir de tecidos contendo altas concentrações de polifenóis e polissacarídeos é um processo difícil, como é o caso do pequi, *Caryocar brasiliense*, espécie com altos teores de compostos secundários em diversos tecidos. O presente trabalho teve como objetivo padronizar métodos de extração de RNA para diferentes tecidos de *Caryocar brasiliense* Cambess, além de validar a qualidade do cDNA sintetizado via qPCR. Com o intuito de conservar a diversidade genética da espécie, a pesquisa foi desenvolvida no Instituto de Ciências Agrárias da UFMG e o material vegetal utilizado foram folhas, raízes e embriões de pequi. As folhas e raízes foram coletadas em mudas com um ano de idade. Os embriões foram extraídos dos frutos em diferentes estádios de maturação, com 40, 50, 60, 80 dias após a antese e recém-dispersos. O RNA total dos tecidos foi extraído pelos métodos CTAB microextração, CTAB macroextração, Fenol a quente e TRI Reagente® Sigma. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições por protocolo. O grau de pureza e concentração de RNA foram quantificados em espectrofotômetro Agilent Technologies – Cary 60. A qualidade do cDNA sintetizado via transcriptase reversa foi testada em análises de qPCR em diferentes concentrações (10, 50 e 100 ng de cDNA/amostra), utilizando o gene endógeno actina. Todos os resultados foram submetidos à análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey a 5%. Os melhores resultados para as folhas foram com o CTAB microextração, com concentração média de RNA 4.025,867 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , enquanto para as raízes o método do fenol á quente, com concentração média de RNA igual a 3716.800 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ . O TRI Reagente® Sigma foi o protocolo mais eficiente para extração de RNA de embriões de pequi, com 40, 50, 60 e 80 dias após a antese e recém-dispersos com concentrações médias de 1.764; 1.791; 2.228; 1.865; 1.699 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  de RNA, respectivamente. O maior grau de pureza e menor contaminação por reagentes, em embriões, folhas e raízes, foram obtidos por meio da aplicação do protocolo TRI Reagente® Sigma. A concentração de 10 ng de cDNA por amostra é eficiente para análises de qPCR.

**Palavras-chave:** cDNA. CTAB microextração. Embrião. Extração de RNA. Fenol. Folha. Pequizeiro. qPCR. Raiz. Recurso genético. Trizol

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Concentração de RNA ( $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) de amostras de RNA total extraídos de embriões recém-dispersos e com 40; 50; 60 e 80 dias após a antese das flores, de raízes e de folhas de *Caryocar brasiliense* Cambess, utilizando os protocolos CTAB microextração, Fenol, CTAB macroextração e TRI Reagente® Sigma.....23

FIGURA 2: Execução do protocolo TRI Reagente® Sigma após a centrifugação. Visualização de três fases: aquosa, com a presença de RNA, rosácea formada pelo fenol e interfase formada pelo clorofórmio. ....24

FIGURA 3: RNA total em gel de agarose 1,5 % corado em gel red, isolado de sementes, raízes e embriões em diferentes estádios de maturação de *Caryocar brasiliense* Cambess, utilizando quatro protocolos: CTAB microextração, CTAB macroextração, Fenol á quente e Trizol reagente®.....15

FIGURA 4: Expressão absoluta de mRNA com diferentes concentrações de cDNA, em folhas, raízes, embrião recém-disperso e com 40 dias de dispersão.....26

TABELA 1: Grau de pureza em espectrofotômetro (relação 260/230 e 260/280) de amostras de RNA total extraídos de embriões recém-disperso e com 40;50;60 e 80 dias após a antese das flores, além de raízes e folhas de *Caryocar brasiliense* Cambess, utilizando os protocolos CTAB microextração, Fenol, CTAB macroextração e TRI Reagente®Sigma.....27

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ICA – Instituto de Ciências Agrárias

RNA – Ácido ribonucleico

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

GEFEN – Grupo de Estudos em Frutíferas Exóticas e Nativas do Cerrado

FAPEMIG – Fundação de Amparo á Pesquisa do Estado de Minas Gerais

CTAB – Brometo de Cetiltrimetilamonio

RNAses – Ribonucleases

DEPC –Dietilpirocarbonato

Rpm – Rotação por minuto

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

qPCR– Reação cadeia polimerase quantitativa

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

ng  $\mu\text{L}^{-1}$  – Nano grama por microlitro

mL – Mililitro

°C – Graus Celsius

M–Molaridade

nm – Nanômetro

RT – Transcriptase reversa

ACT –  $\beta$ -actina

ANOVA – Análise de variância

$\mu\text{L}$  – microlitro

ng – nanograma

mRNA – RNA mensageiro

$\beta$  – Beta

TRI – Trizol

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>12</b>
<i>2.1 Pequizeiro .....</i>	<i>12</i>
<i>2.2 Extração de RNA total.....</i>	<i>13</i>
<i>2.3 Análise de expressão gênica.....</i>	<i>15</i>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 Material Vegetal.....</b>	<b>16</b>
<i>3.2 Protocolos de Extração RNA total.....</i>	<i>17</i>
<i>3.2.1 Fenol á quente.....</i>	<i>17</i>
<i>3.2.2 TRI reagente® Sigma.....</i>	<i>17</i>
<i>3.2.3 CTAB microextração.....</i>	<i>18</i>
<i>3.2.4 CTAB macroextração.....</i>	<i>18</i>
<i>3.3 Quantificação da pureza, produção e integridade do RNA total.....</i>	<i>19</i>
<i>3.4 Validação da qualidade do cDNA.....</i>	<i>19</i>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>28</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A extração de RNA em alta qualidade e quantidade é um importante procedimento e fator determinante para estudos de biologia molecular que envolvem expressão gênica, incluindo transcriptase reversa (RT), PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), construção de bibliotecas de cDNA ou análises de *microarray*. O isolamento de RNA a partir de folhas, raízes e embriões de *Caryocar brasiliense* Cambess, em diferentes estádios de maturação pode ser um processo particularmente difícil, devido à presença de compostos secundários em altas concentrações, como polifenóis e polissacarídeos. Os compostos secundários variam muito em quantidade e qualidade nos vegetais, o que leva a utilização de um método específico para o isolamento de ácidos nucleicos (RNA ou DNA) conforme a espécie (CHANG *et al.*, 1993; MITRA AND KOOTSTRA, 1993; SALZMAN *et al.*, 1999; ZENG AND YANG, 2002; GESTEIRA *et al.*, 2003; GASIC *et al.*, 2004). Popularmente conhecido como pequi, o *Caryocar brasiliense* Cambess, é uma espécie arbórea nativa do Cerrado, distribuída geograficamente nos estados do Pará, Tocantins, no Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, São Paulo, Minas Gerais e Paraná (FLORA DO BRASIL, 2017). Explorada intensamente por meio do extrativismo, a espécie é fonte de renda e emprego para as comunidades nos locais de ocorrência (AFONSO *et al.*, 2015). Seus frutos, oleaginosos, são utilizados para consumo *in natura* ou como subprodutos em forma de óleo, doce, polpa, licores, sorvetes e conservas (BARRADAS, 1973). Estima-se que 20% das espécies nativas do Cerrado já não ocorrem em áreas protegidas, sendo este o bioma brasileiro que mais sofreu alterações com a ocupação humana depois da Mata Atlântica. A expansão agropecuária em grandes propriedades, para a implantação de culturas e pastagens, somada à alta demanda por frutos leva ao extrativismo intenso, gerando um progressivo esgotamento dos recursos naturais colocando em risco a diversidade genética das espécies, o que justifica estudos a nível molecular (GIROLDO; SCARIOT, 2015).

Visando a obtenção de um protocolo ideal para extração de RNA de qualidade para raiz, folha e embrião de *Caryocar brasiliense* Cambess em diferentes estádios de maturação, foram testados quatro métodos de extração. Objetivou-se com este trabalho identificar a metodologia mais adequada para isolar amostras de RNA, avaliar a integridade das amostras de RNA e possíveis contaminações. Bem como validar a qualidade do cDNA analisado via qPCR.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Pequiizeiro

*Caryocar brasiliense* Cambess, o pequiizeiro, da família Caryocaraceae, é uma espécie nativa do Cerrado. Possui porte elevado, com altura acima de 10 metros, mas também pode apresentar porte pequeno, dependendo de fatores genéticos e ambientais da planta (LOPES *et al.*, 2010). As folhas são compostas, trifoliadas, opostas, com limbo oval, base aguda e obtusa no folíolo central e desigual nos folíolos laterais, verdes e brilhantes, com ausência de pelos e de glândulas. Suas laterais são serreadas, denteadas ou crenadas (ALMEIDA; SILVA, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 2008). As plantas de *C. brasiliense* Cambess são autocompatíveis, porém a maior parte dos frutos é produzida por fecundação cruzada (LOPES *et al.*, 2010), tendo como polinizadores efetivos os morcegos nectarívoros *Glossophaga soricinae* e *Anoura geoffroyi* (GRIBEL; HAY, 1993). A espécie apresenta a primeira floração na estação seca, normalmente nos meses de julho a setembro, mas em alguns anos pode ocorrer uma segunda florada no final da estação chuvosa. O pequiizeiro apresenta raízes profundas e pivotantes, e com enorme capacidade de se desenvolver em solos rasos e em ambientes pobres em nutrientes e minerais e com elevado teor de alumínio (NAVES, 1999).

Em cada planta podem-se encontrar entre 500 e dois mil frutos. Eles apresentam de seis a 14 cm de comprimento por seis a dez cm de diâmetro. O peso por unidade varia de 100 a 300 gramas. O número de sementes varia de um a quatro por fruto e são oleaginosas de cor branca (amêndoa) e se apresentam em forma de um pequeno rim (ALMEIDA; SILVA, 1994). Os frutos de *C. brasiliense* Cambess apresentam alto valor nutricional por serem ricos em óleos, vitaminas, proteínas, carboidratos, fibras e carotenoides (ASCARI *et al.*, 2013). No âmbito ecológico, os frutos são fonte de alimento para os animais silvestres. A coleta dos frutos é realizada por extrativistas de diferentes idades que tradicionalmente, na época da safra, usufruem da atividade como renda complementar (AFONSO *et al.*, 2015). Entretanto, o extrativismo intenso dos frutos e o uso da terra para as atividades agrossilvipastoris têm contribuído para diminuir a densidade de plantas jovens. Com isso, torna-se importante desenvolver

estratégias de proteção dessa espécie, ligadas ao seu uso econômico (GIROLDO; SCARIOT, 2015).

## 2.2 Extração de RNA total

As pesquisas na área de biologia molecular têm evoluído rapidamente e novas técnicas para identificação, monitoramento e preservação do material genético das espécies têm se mostrado importante. O isolamento do ácido ribonucleico (RNA), um polímero constituído por nucleotídeos unidos por ligações fosfodiéster, componentes essenciais contendo a ribose, como açúcar de fita unifilamentar (PIERCE, 2009), é um dos pré-requisitos para estudo de expressão gênica, incluindo a transcriptase reversa (RT), PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), construção de bibliotecas de cDNA ou análises de *microarray* (CARDILLO *et al.*, 2006). Trabalhos que utilizam diferentes tecidos e/ou estádios de desenvolvimento são de extrema importância ao estabelecimento de protocolos que garantem a obtenção de RNA de qualidade e em concentrações desejáveis, a fim de minimizar as variações que possam existir.

O RNA pode ser obtido a partir de diversos tipos de tecidos vegetais, como folhas, raízes ou sementes. De acordo com Santos (2016) foi possível extrair RNA a partir sementes de pimenta habanero (*Capsicum chinense*) em diferentes estádios de desenvolvimento. Sementes em geral apresentam níveis elevados de compostos fenólicos, polissacarídeos e RNases (JAAKOLA *et al.*, 2001), dificultando o processo de extração. A quantidade e qualidade de RNA são influenciadas por esses polissacarídeos, formando uma estrutura gelatinosa que precipita durante a extração (SHARMA *et al.*, 2003). A principal dificuldade na extração de RNA é a grande quantidade de ribonucleases (RNases), 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. Os métodos para isolamento de RNA baseiam-se na desnaturação e lise celular através de fenóis e sais de guanidina, permitindo a sua total liberação e a inativação de ribonucleases (AUSUBEL, 1987). Para diminuir a contaminação com RNases das soluções,

vidrarias e reagentes devem ser previamente autoclavadas e/ou tratados com Dietilpirocarbonato (DEPC) agente inibidor de RNAses (GEUNA *et al.*,1998).

Para a extração de RNA já existem na literatura alguns protocolos padronizados para diferentes espécies e tecidos. O protocolo fenol a quente foi adaptado por Scherrer & Darnell (1962). O fenol é um composto orgânico que ao se misturar com clorofórmio, líquido incolor, atua nas amostras como agente desnaturante de proteínas. A mistura de fenol e clorofórmio é muito eficiente para desproteinizar e sua ação se fundamenta na propriedade hidrófoba das proteínas que apresentam afinidade por solventes orgânicos.

O protocolo TRI reagent® Sigma é composto pelo reagente Trizol, que é uma solução monofásica de fenol e guanidinaisotiocianato. Esse reagente mantém a integridade do RNA, perturbando ao mesmo tempo as células e solubilizando 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. Após a centrifugação três fases poderão ser observadas, uma aquosa onde estará presente o RNA, uma rosácea formada pelo fenol e uma interfase formada pelo clorofórmio (LIMA, 2008). Posteriormente, o RNA é recuperado por precipitação com isopropanol. O DNA e as proteínas permanecem em fase orgânica e podem ser extraídos posteriormente. Esse protocolo é recomendado para pequenas quantidades de tecido, 50 a 100 mg, sendo possível processar um grande número de amostras ao mesmo tempo. Seus custos são baixos e todo o procedimento pode ser completado em uma hora.

O protocolo CTAB microextração foi adaptado por Chang *et al.* (1993) e tem sido utilizado em uma ampla variedade de plantas por ser eficiente, ter baixo custo e adequado para uso em conjunto com outros protocolos. O método CTAB utiliza substâncias que reduzem compostos fenólicos, e a precipitação realizada através do cloreto de lítio, que retém substâncias protéicas, auxiliando na descontaminação das amostras.

O protocolo CTAB macroextração foi descrito por Bekesiova (1999) e é dividido em duas etapas: pré-overnight e pós-overnight. Um dos reagentes fundamentais é o clorofórmio: álcool isoamílico, que previne a formação de espuma quando a mistura é agitada, o que torna mais fácil a separação da fase orgânica e da fase aquosa. O

cloreto de lítio atua na desnaturação protéica auxiliando, na descontaminação das amostras.

Realizada a extração de RNA, é necessário quantificá-lo e avaliar a pureza da amostra, onde são observados valores de absorvância a 280, 260 e 230nm. A relação de absorvância  $A_{260}/A_{230}$  indica a contaminação da amostra por polifenóis ou polissacarídeos, a relação  $A_{260}/A_{280}$  indica a contaminação por proteína (GASIC *et al.*, 2004). Valores entre 1,8-2,1 indicam amostras livres de contaminação (ASIF *et al.*, 2006).

### 2.3 Análise de expressão gênica

A Síntese de DNA complementar (cDNA) é realizada pela transcriptase reversa, enzima de origem vegetal, através da produção de uma molécula de DNA de fita dupla a partir da cópia de uma molécula de RNA mensageiro. Seguindo o caminho contrário da RNA polimerase, a qual, a partir de uma fita de DNA produz RNA mensageiro. A obtenção de RNA de qualidade e concentrações ideais é um dos requisitos fundamentais para obter sucesso com a síntese de cDNA (JAAKOLA *et al.*, 2010). A reação em cadeia polimerase em tempo real - qPCR, uma variante da PCR convencional, é considerada a técnica mais precisa e eficiente da biologia molecular para fornecimento de expressão gênica em diferentes amostras (BUSTIN *et al.*, 2009). Criada em 1992 por Higuchi *et al.*, a reação de qPCR é precedida pela reação de PCR via transcriptase reversa, seguida da transformação do mRNA, isolado, em cDNA (BUSTIN, 2000). A qPCR consiste na amplificação de uma região específica do DNA, por meio de três reações cíclicas repetidas: desnaturação da matriz, hibridação e alongamento de iniciadores (GACHON *et al.*, 2004). É possível visualizar a imagem em tempo real, por meio de corantes fluorescentes especiais, com o SYBR Green I, o qual se liga ao DNA de cadeia dupla (HUGGETT & BUSTIN, 2011). A fim de aumentar o número de cópias de ácidos nucléicos, a qPCR envolve o emprego de quatro nucleotídeos (dNTP's) do DNA, sequências iniciadoras conhecidas como primers, além de uma DNA polimerase termoestável (COSTA, 2010). A partir de uma fita molde, é possível obter várias cópias específicas de uma sequência de ácido nucléico.

Para a validação da técnica de qPCR utiliza-se genes de referências os quais controlam as reações através de sequencias diferentes do alvo (THELLIN *et al.*, 2009). Para que um gene de referência seja considerado ideal, é necessário que ele expresse a

nível constante em todos os tecidos de desenvolvimento, independentemente das condições ambientais ou tratamentos (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Os genes comumente usados são  $\beta$ -actina (ACT),  $\alpha$ -tubulina (TUA), ubiquitina (UBQ), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), 18S ou 26S ribossômicos RNA e fatores de alongamento (EF) foram validados como genes de controle interno adequados em muitas plantas (MAROUFI *et al.*, 2010; NICOT *et al.*, 2005). Os níveis de transcrição dos genes de referência variam constantemente de acordo com o estágio de desenvolvimento e condições distintas (VANDESOMPELE *et al.*, 2002).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Material Vegetal

O experimento foi realizado nos Laboratórios de Biotecnologia e Laboratório de Química, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais e no Laboratório de Micropropagação da Unimontes. Foram testados quatro métodos de extração de RNA: Fenol á quente, adaptado por Scherrer & Darnell (1962); TRI reagent® Sigma; CTAB microextração, adaptado por Chang *et al.* (1993) e CTAB macroextração, adaptado por Bekesiova *et al.* (1999). Os tecidos vegetais analisados foram folhas, raízes e embriões de *Caryocar brasiliense* Cambess com 40, 50, 60, 80 dias após a antese das flores e recém-dispersos (90 dias). As folhas de *Caryocar brasiliense* Cambess foram selecionadas com aproximadamente um ano de desenvolvimento. Para a maceração foi utilizado em média 10 folhas sadias e jovens por protocolo, retirou-se a nervura principal e descartaram-se folhas danificadas. Raízes secundárias jovens a partir de quatro mudas de pequizeiro, com um ano de desenvolvimento foram selecionadas. Para análise dos embriões de pequi em diferentes estágios de maturação foram selecionadas 29 plantas com aproximadamente 10 anos de idade, em um pomar localizado no Instituto de Ciências Agrárias, no município de Montes Claros – Minas Gerais. A data da antese das flores foi registrada e coletas semanais dos frutos em desenvolvimento até os 90 dias após a antese foram realizadas (RODRIGUES, 2017).

Para extração de RNA os tecidos vegetais foram macerados em nitrogênio líquido usando cadinho e pistilo. As soluções utilizadas foram preparadas com água destilada autoclavada e as vidrarias também passaram pelo processo de autoclavagem.

## **3.2 Protocolos de Extração RNA total**

### **3.2.1 Fenol á quente**

Em torno de 100 mg dos diferentes tecidos vegetais (folhas, raízes, e embriões aos 40; 50; 60; 80 dias e recém- dispersos) foram macerados com nitrogênio líquido e colocados em microtubos de 2 mL. Imediatamente foi adicionado 500 µL de fenol ácido e posteriormente agitado em vórtex por 10 segundos. Em seguida, incubou-se em banho maria a 65°C durante uma hora, vortexando novamente a cada 10 minutos. A amostra foi incubada em banho de gelo por 5 minutos e em seguida, centrifugada por 5 minutos a 14.000 rpm. A fase superior foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL. Novamente, adicionou-se 500 µL de fenol ácido e agitou-se em vórtex por 10 segundos. Incubou-se a amostra em banho de gelo por 5 minutos e, em seguida, levou-se a centrifuga por 5 minutos a 3.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL. Adicionou-se 500 µL de clorofórmio e vortexou por 10 segundos. Posteriormente, o material foi centrifugado a 3.000 rpm por 5 minutos. A fase superior foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL e 50 µl de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e 1 mL de etanol gelado foi adicionado. Em seguida, incubou-se a amostra por 1 hora á -20°C e centrifugou-se a 4.000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol gelado a 70%. O sobrenadante foi removido e o pellet secado por 10 minutos. Após esse período, o pellet foi ressuspendido em 30 µL de água DEPC 0,1% (SCHERRER & DARNELL, 1962).

### **3.2.2 TRI reagente® Sigma**

Para a análise do método do Trizol reagente® Sigma, foi adicionado 1 mL do reagente em 100 mg de tecido e incubado por 15 minutos á temperatura ambiente. Em seguida o material foi centrifugado a 12.000 rpm durante 15 minutos. Após a centrifugação, foram adicionados 200 µL de clorofórmio, seguido de agitação por 5 segundos e mantido em repouso na posição horizontal por 10 minutos, á temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo, acrescentando-se 0,5 mL de isopropanol. A amostra foi incubada á temperatura ambiente por 10 minutos e

centrifugada a 12.000 rpm, durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL de etanol 75%, centrifugando a 7.500 rpm ambiente durante 5 minutos. O sobrenadante foi removido, o pellet seco foi ressuspensionado em 30 µL de água com DEPC a 0,1% (INVITROGEN, manual e procedimentos disponíveis).

### **3.2.3 CTAB microextração**

Foram utilizados 100 mg de tecido previamente macerado e colocado em microtubos de 2 mL. Foram adicionados 500 µL da solução tampão de extração (CTAB 2%; NaCl 2,0M; EDTA 25mM; Tris HCl 100mM; PVP 2%) agitado levemente e incubado a 65°C por 30 minutos. Acrescentou-se 500 µL de clorofórmio e incubou-se a amostra a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida centrifugou-se a 7.500 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo de 2,0 mL e acrescido de 300 µL de clorofórmio e novamente centrifugado a 7.500 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo de 1,5 mL e adicionado cloreto de lítio 10,0M por 24 horas a 4°C para precipitação do RNA. Novamente foi realizada a centrifugação a 8.000 rpm durante 30 minutos. O sobrenadante foi removido e o pellet secado por 10 minutos, e ressuspensionado em 30 µL de água com DEPC a 0,1% (CHANG, 1993).

### **3.2.4 CTAB macroextração**

Foram utilizados 100 mg de tecido previamente macerado e colocado em microtubo de 2 mL. Foram adicionados 700 µL da solução tampão de extração (CTAB 2%; NaCl 2,0M; EDTA 25mM; Tris HCl 100mM; PVP 2%; β-mercaptoetanol 2%) e agitado levemente e incubado a 65°C por 15 minutos, invertendo os tubos a cada cinco minutos. Acrescentou-se 1 mL da solução de clorofórmio: álcool isoamílico e invertiu-se os tubos por 2 minutos. Transferiu-se a fase aquosa para um novo microtubo e repetiram-se os dois últimos passos respectivamente. A fase aquosa foi colocada em novos microtubos e adicionou-se o equivalente a 1/4 do volume de Cloreto de lítio a 10,0 M. Incubou-se a amostra por 24 horas a 4°C. Em seguida centrifugou-se a 10.000 rpm durante 20 minutos. Acrescentou-se 50 µL de água com DEPC a 0,1%, repetir a precipitação com 5 µL de

acetato de sódio 3M e 2,5 do volume de etanol absoluto. Inverteram-se os tubos por 2 minutos e incubou-se em freezer á -20°C, por duas horas. Em seguida, centrifugou-se a amostra por 20 minutos á 10.000 rpm. Dissolveu-se o pellet em 30 µL de água com DEPC a 0,1% (BEKESIOVA *et al.*, 1999).

### **3.3 Quantificação da pureza, produção e integridade do RNA total**

A integridade das amostras de RNA foi avaliada através da eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com gel red, posteriormente visualizado sob luz ultravioleta – Transilluminator. As concentrações de RNA foram quantificadas em espectrofotômetro Agilent Technologies – Cary 60 por meio de análise de absorvância em 260 nm, a pureza foi realizada pela análise da relação de absorvância 230\260nm (contaminação por reagentes) e 280/260 nm (contaminação por proteínas).

### **3.4 Validação da qualidade do cDNA**

As amostras de RNA total foram tratadas com DNase após o processo de extração, usando o Kit Turbo DNA-free (Ambion, Inc.), (1 µL de DNase). A ausência de contaminação com DNA genômico foi confirmada por PCR negativo, empregando-se oligonucleotídeos específicos para amplificação do gene endógeno da β-actina (F-5'CTCTCCTTGTACGCCAGTGGTC3'; R-5'TAAGGTCACGTCCAGCAAGGTC3'). A reação de transcrição reversa foi realizada usando o kit reverse transcription (AppliedBiosystems, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Todos os procedimentos de qPCR, incluindo testes, validações e experimentos, foram conduzidos no aparelho ABI 7500 (AppliedBiosystems, EUA). O gene da β-actina (ACT) foi utilizado para validar o cDNA sintetizado em diferentes concentrações de análise (10, 50 e 100 ng por amostra).

As reações de qPCR foram conduzidas em quadruplicata, em volume de reação de 20 µL, contendo cDNA (10, 50 ou 100 ng), primers (F+R) na concentração de 50 nM, 10 µL de PowerUp<sup>TM</sup>SYBR®Green Master Mix (AppliedBiosystems, EUA) e 5 µL de água Milli-Q esterilizada por autoclavagem. As condições de amplificação foram realizadas utilizando-se as seguintes etapas: (1) ativação da Taq DNA polimerase a 50 °C por 2 minutos, (2) desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, (3) desnaturação a 95

°C por 15 segundos , (4) anelamento a 60 °C por 20 segundos e (5) extensão a 60°C por 1 minuto. As etapas 3 a 5 foram repetidas por 40 ciclos.

Reações controle desprovidas de cDNA (NTC) também foram utilizadas em todos os experimentos. O programa Dissociation Curve 1.0 (AppliedBiosystems, EUA) foi usado para verificar que somente um único produto de PCR foi gerado pela amplificação dos transcritos.

O experimento foi montado e delineamento inteiramente casualizado e com quatro repetições por protocolo. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey em nível de 5% de probabilidade.

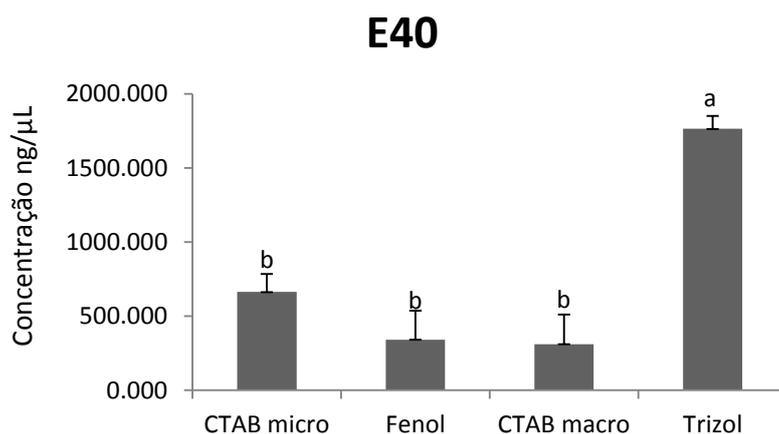
#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

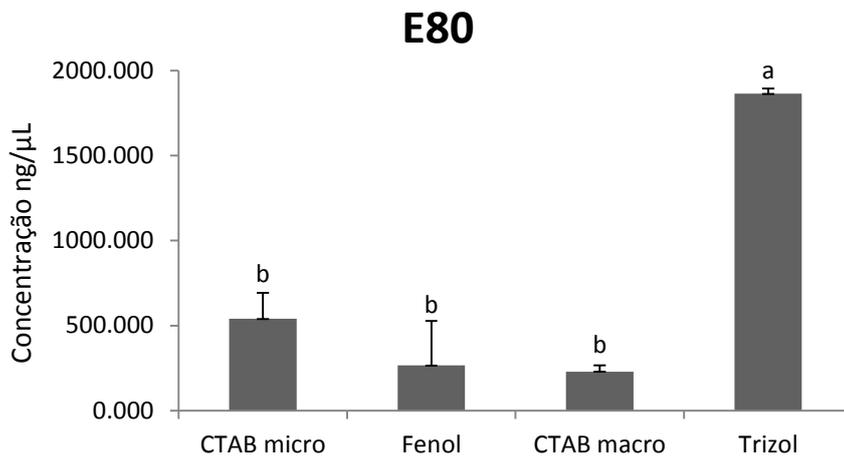
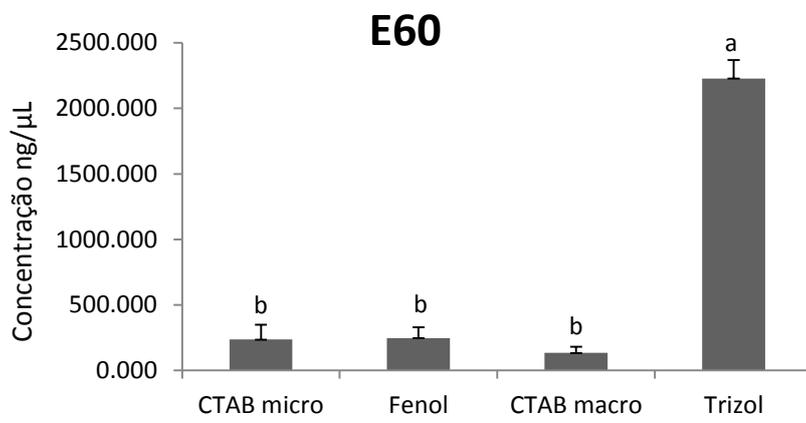
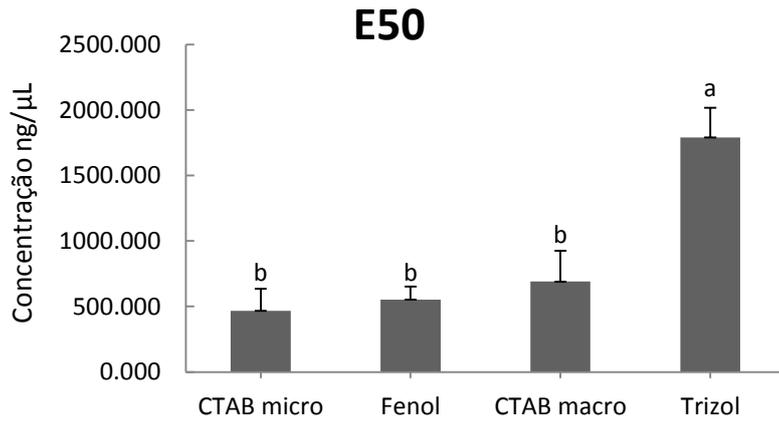
Para os embriões com 40; 50; 60; 80 dias após a antese das flores e recém – dispersos (90 dias), o método de extração mais eficiente foi o TRI reagente® Sigma apresentando respectivamente as seguintes concentrações médias: 1.764; 1.791; 2.228; 1.865; 1.699 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ (Figura 1). O método do TRI Reagente® Sigma é frequentemente recomendado para extração de RNA total, devido à adição de isopropanol, reagente que contribui para a separação do RNA das proteínas. A adição de clorofórmio, devido à separação da solução em uma fase aquosa e outra orgânica, favoreceu a solubilização de lipídeos. Além disso, o guanidinaisotiocinato foi outro reagente que manteve a integridade do RNA, perturbando ao mesmo tempo as células e solubilizando seus componentes. Após a centrifugação foi possível visualizar três fases, uma aquosa onde estava presente o RNA, uma rosácea formada pelo fenol e uma interfase formada pelo clorofórmio (Figura 2).

Sementes de *Caryocar brasiliense*, por possuírem altos teores de compostos fenólicos e proteínas (ARAÚJO *et al.*, 2016), formam uma camada gelatinosa durante o processo de extração, afetando a quantidade e qualidade do RNA (SHARMA *et al.*, 2003). Compostos fenólicos e protéicos podem variar de acordo com o estágio de maturação das sementes, fator que pode afetar a extração de RNA em alguns estádios e em outros não (Tabela 1). Segundo Gasic *et al* (2004), as razões de absorvância 260/230 nm e 260/280 nm indicam contaminação por proteínas e polissacarídeos/polifenóis sendo e o valor ideal para considerar amostras de RNA livres de contaminantes é entre 1,8-2,0 (LOGEMANN *et al.*, 1987; MANNING, 1991). O TRI reagente® Sigma foi o único protocolo que apresentou ausência de contaminação(Tabela 1).

Para folhas de *Caryocar brasiliense* o protocolo mais eficiente foi CTAB microextração, adaptado por Chang *et al.* (1993), com concentrações de RNA igual á  $4025.867\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$ , superior aos demais protocolos (Figura 1). Esse protocolo tem como reagentes o clorofórmio:álcool-isoamílico, acetato de sódio e cloreto de lítio, sendo este último, responsável pela redução de substâncias protéicas, auxiliando na descontaminação das amostras. A junção desses reagentes contribuiu para as melhores concentrações de RNA total extraído a partir de folhas de pequiizeiro. As  $A_{(260/280)}$ e  $A_{(230/260)}$  não estiveram entre 1,8 e 2,0 indicando contaminação das amostras por proteínas, polifenóis e polissacarídeos, sendo o TRI Reagente® Sigma o único protocolo que manteve as amostras livre de contaminação (Tabela 1).

Para raízes de *Caryocar brasiliense* o protocolo mais eficiente foi o fenol a quente, com concentração de RNA total igual a  $3.716,800\text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  (Figura 1). O fenol é um composto orgânico que ao se misturar com o clorofórmio, atua como agente desnaturante de proteínas. O método do fenol á quente, mesmo utilizando substâncias que reduzem compostos proteicos e polifenóis, não apresentou resultado satisfatório para raízes de pequiizeiro em relação á contaminação, uma vez que os valores de absorbância não estiveram entre 1,8-2,0 (Tabela 1). Ressalta-se ainda, que o Fenol pode causar danos a cauda poli-A do mRNA extraído (AZEVEDO *et al.*, 2003), dificultando a síntese do cDNA e análises posteriores.





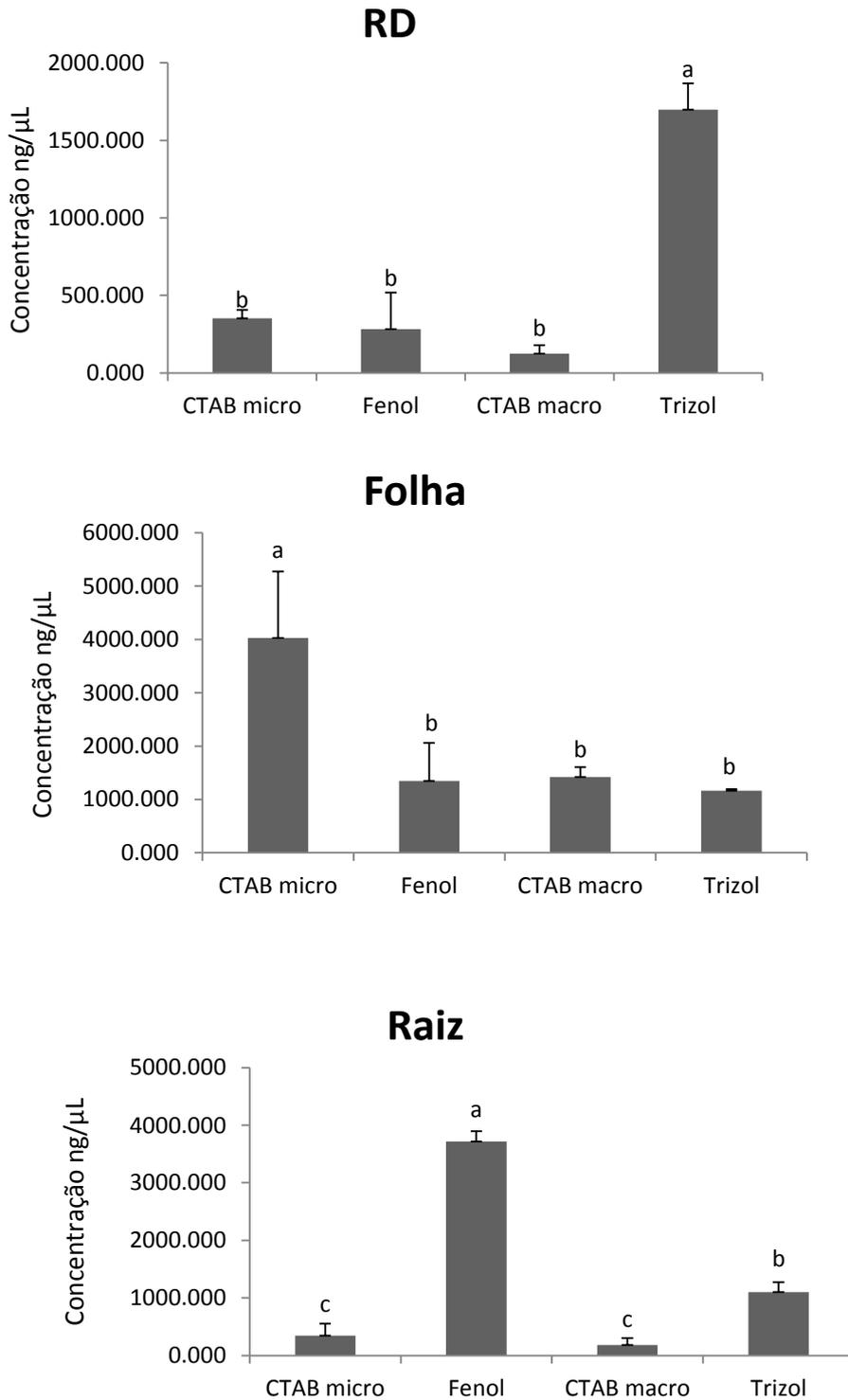


Figura 1 - Concentração de RNA ( $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) de amostras de RNA total extraídos de embriões recém-dispersos e com 40; 50; 60 e 80 dias após a antese das flores, de raízes e de folhas de *Caryocar brasiliense* Cambess, utilizando os protocolos CTAB microextração, Fenol, CTAB macroextração e TRI Reagente® Sigma.

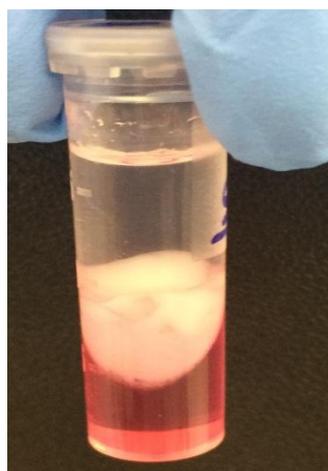


Figura 2- Execução do protocolo TRI Reagente® Sigma após a centrifugação. Visualização de três fases: aquosa, com a presença de RNA, rosácea formada pelo fenol e interfase formada pelo clorofórmio.

Na extração realizada utilizando o CTAB macroextração descrito por Bekesiova (1999) foi observado um baixo rendimento em relação à extração de RNA nos diferentes tecidos e estádios de desenvolvimento do embrião de *Caryocar brasiliense* (Figura 1). Verificou-se também uma alta contaminação, podendo ser resultante da presença de proteínas e compostos polifenólicos (Tabela 1).

Tabela 1 - Grau de pureza em espectrofotômetro (relação 260/230 e 260/280) de amostras de RNA total extraídos de embriões recém-disperso e com 40; 50;60 e 80 dias após a antese das flores, além de raízes e folhas de *Caryocar brasiliense* Cambess, utilizando os protocolos CTAB microextração, Fenol, CTAB macroextração e TRI Reagente® Sigma.

E40	Microextração	Fenol	Macroextração	TRI Reagente®
Razão				
260/230	2.1±0.683	1.18±0.380	1.49±0.452	1.97±0.0164
Razão				
260/280	2.06±0.106	1.34±0.231	1.52±0.490	1.88±0.250
E50	Microextração	Fenol	Macroextração	TRI Reagente®
Razão				
260/230	1.7±0.144	1.77±0.612	1.97±0.536	2.00±0.1298
Razão				
260/280	1.7±0.120	1.79±0.514	1.68±0.483	1.81±0.046

E60	Microextração	Fenol	Macroextração	TRI Reagente®
Razão				
260/230	1.50±0.085	1.43±0.287	1.40±0.340	2.08±0.1081
Razão				
260/280	1.20±0.248	1.44±0.117	1.41±0.340	1.89±0.0815
E80	Microextração	Fenol	Macroextração	TRI Reagente®
Razão				
260/230	1.50±0.504	1.13±0.212	1.22±0.077	2.09±0.0101
Razão				
260/280	1.85±0.657	2.02±0.751	1.63±0.076	1.83±0.0820
RD	Microextração	Fenol	Macroextração	TRI Reagente®
Razão				
260/230	1.48±0.603	1.60±0.0803	1.52±0.653	1.97±0.0918
Razão				
260/280	1.46±0.710	1.74±0.681	1.57±0.153	1.80±0.0484
Folha	Microextração	Fenol	Macroextração	TRI Reagente®
Razão				
260/230	1.32±0.710	1.53±0.681	1.47±0.153	1.87±0.0620
Razão				
260/280	1.37±1.251	1.72±0.716	1.78±0.185	1.86±0.0654
Raízes	Microextração	Fenol	Macroextração	TRI Reagente®
Razão				
260/230	1.68±0.775	1.40±0.051	1.48±0.155	2.13±0.1120
Razão				
260/280	1.70±0.070	1.71±0.223	1.65±0.417	1.88±0.0850

A integridade das amostras de RNA total extraído pode ser observada na Figura 3 por meio da análise visual das bandas de RNA. Por meio da análise dos géis de agarose 1,5 % foi possível verificar que a extração de RNA, a partir de sementes em diferentes estádios de maturação, raízes e folhas de *Caryocar brasiliense* Cambess permitiu a obtenção de ácido ribonucléico em alta qualidade (Figura 3).

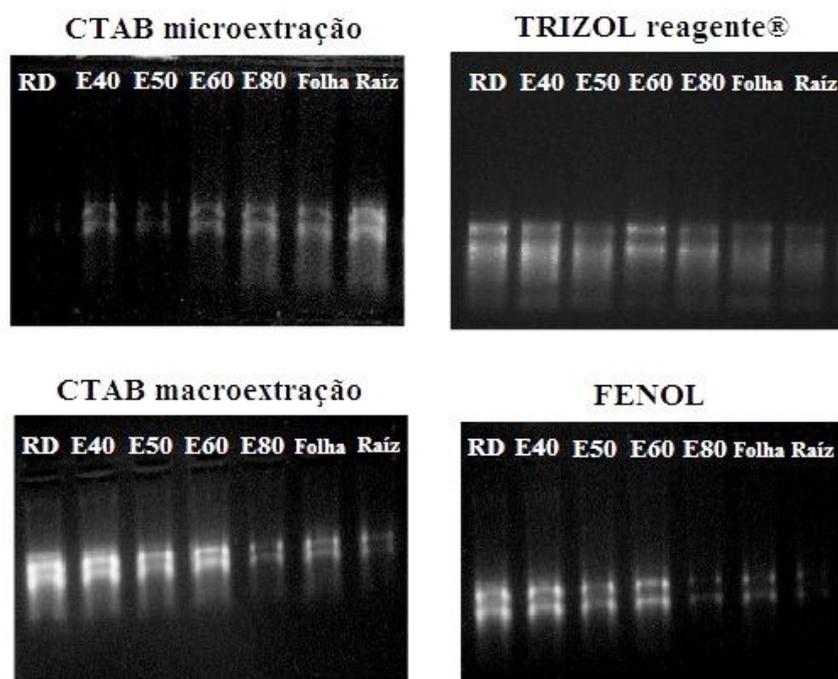
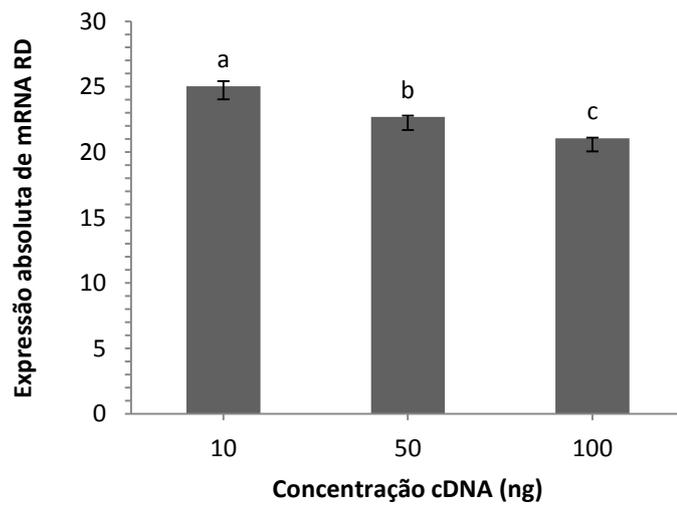
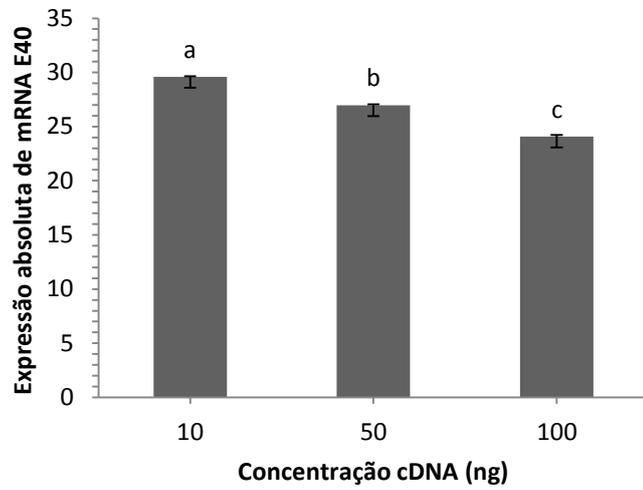


Figura 3 - RNA total em gel de agarose 1,5 % corado em gel red, isolado de sementes, raízes e embriões em diferentes estádios de maturação de *Caryocar brasiliense* Cambess, utilizando quatro protocolos: CTAB microextração, CTAB macroextração, Fenol á quente e Trizol reagente®.

O gene endógeno selecionado para a validação do cDNA foi o  $\beta$ -actina (ACT), previamente preparado em diferentes concentrações de análise (10, 50 e 100 ng por amostra). A fim de evitar variabilidade das amostras, todas as concentrações de RNA total extraídas foram ajustadas para 10  $\mu$ L. Usou-se para a conversão em cDNA somente RNA dos protocolos que obtiveram melhores concentrações, priorizando aqueles livres de contaminação por proteínas, polifenóis e polissacarídeos. O padrão da qualidade dos embriões imaturos: 50, 60 e 80 dias após a antese não distinguiram entre si, justificando a análise de qPCR somente em embriões com 40 dias de maturação e recém-dispersos (embrião imaturo), além de folha e raízes. A concentração de cDNA avaliada foi satisfatória para essas partes da planta, confirmando a validação do método. Foi constatado que 10 ng de cDNA já foi suficiente para a validação e quantificação do método (Figura 4). O gene endógeno ACT foi considerado um bom normalizador, uma

vez que ele atendeu aos requisitos importantes, tendo sua expressão estável entre as amostras, independente dos tratamentos aplicados.



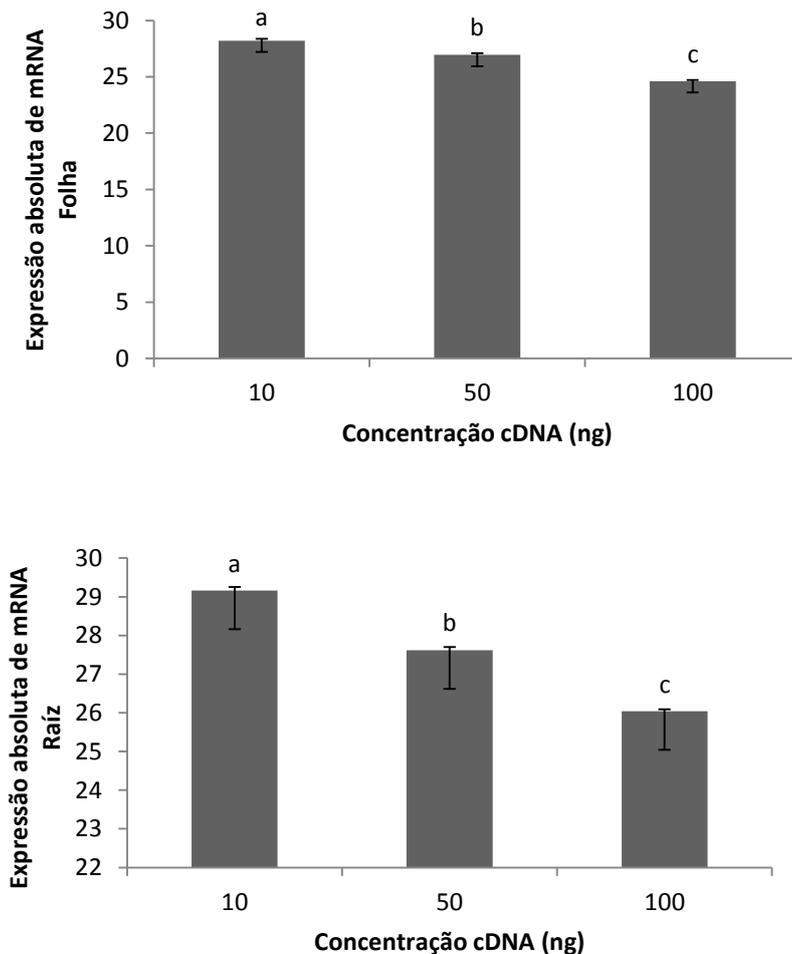


Figura 4 - Expressão absoluta de mRNA com diferentes concentrações de cDNA, em folhas, raízes, embrião recém-disperso e com 40 dias de dispersão

## 5. CONCLUSÃO

Para embriões com 40, 50, 60 e 80 dias após a antese e recém-dispersos o TRI Reagente® Sigma foi o protocolo mais eficiente produzindo um RNA de qualidade e que evitou a contaminação por proteínas, polifenóis e polissacarídeos. A qualidade do cDNA observado é satisfatória, sendo que 10 ng de cDNA por amostra já é suficiente para a quantificação. Já para as folhas, o CTAB microextração foi o que apresentou resultado superior, enquanto para as raízes foi o fenol á quente.

A amplificação do gene da actina via qPCR foi eficiente, indicando boa qualidade das amostras de RNA.

## 6. REFERÊNCIAS

AFONSO, S. R.; ANGELO, A. H.; ALMEIDA A. N. Caracterização da produção de Pequi em Japonvar, MG. **Revista Floresta**, v. 45, p. 49-56, 2015.

ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A. Piqui e buriti: importância alimentar para a população dos cerrados. Planaltina: **Embrapa-cpac**, 1994. 38 p.

ARAÚJO, ANA CRISTINA MOREIRA ANDRADE. **Obtenção do óleo de sementes dos frutos do cerrado pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) e murici (*Byrsonimacrassifolia*) utilizando diferentes solventes no processo de extração / Ana Cristina Moreira Andrade Araújo. – Lavras: UFLA, 2016.**

ASCARI, J.; TAKAHASHI, J.A.; BOAVENTURA, M.A.D. The Phytochemistry and Biological Aspects of Caryocaraceae Family. **Revista Brasileira de plantas medicinais**, Campinas, v.15, n.2, p.293-308, 2013.

ASIF, M.; TRIVEDI, P.; SOLOMOS, T.; TUCKER, M. 2006. Isolation of high-quality RNA from apple (*Malus domestica*) fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.54, n.15, p.5227-5229.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**, New York: John Wiley, 2003. 4755 p.1987

AZEVEDO, H.; LINO-NETO, T.; TAVARES, R.M. 2003. An improved method for high quality RNA isolation from needles of adult maritime pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, Düsseldorf, v. 21, p. 333-338.

BARRADAS, M. M. Morfologia do fruto e da semente de *Caryocar brasiliense* (piqui) em várias fases de desenvolvimento. **Revista de Biologia**, [S.l.], v. 9, p. 69-84, 1973.

BEKESIOVA, I., NAP, J:P& MLYNAROVA, L. 1999. Isolation of high quality DNA and RNA from leaves of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia*. **Plant Molecular Biology Reporter** 17: 269–277.

BUSTIN SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol** 25:169–193

BUSTIN SA, BENES V, GARSON JA, HELLEMANS J, HUGGETT J, et al. (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clin Chem** 55: 611–622.SA

CARDILLO, A. B.; GIULIETTI, A. M.; MARCONI, P. L. 2006. Analysis and sequencing of h6hmRNA, last enzyme in the tropane alkaloids pathway from anthers and hairy root cultures of *Brugmansia candida* (Solanaceae). **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v.9, p.196-198.

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

COSTA, RONALDO DE JESUS. Técnica de Biologia Molecular: PCR (Reação em cadeia da Polimerase). Disponível em: <http://www.portaleducacao.com.br/farmacia/artigos/8577/técnica-de-biologia-molecular-pcr-reacao-em-cadeia-da-polimerase>. Acesso em 27 de maio de 2017.

FLORA DO BRASIL. Lista de espécies da Flora do Brasil. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/> Acesso em: 19 abr. 2017.

GACHON C, MINGAM A, CHARRIER B (2004) Real-time PCR: what relevance to plant studies? **J Exp Bot** 55:1445–1454.

GASIC K, HERNANDEZ A AND KORBAN SS (2004).RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. **Plant Mol. Biol. Rep.** 22: 437-438.

GESTEIRA AS, MICHELI F, FERREIRA CF AND CASCARDO JC (2003). Isolation and purification of functional total RNA from different organs of cacao tree during its interaction with the pathogen *Crinipellis pernicioso*. **Biotechniques** 35: 494-496.

GEUNA, F.; HARTINGS, H.; SCIENZA, A. 1998.A new method for rapid extraction of high quality RNA from recalcitrant tissues of grapevine. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v.16, p.61-67.

GIROLDO, A. B.; SCARIOT, A. Land use and management affects the demography and conservation of an intensively harvested Cerrado fruit tree species, **Biological Conservation**, v.191, p. 150-158, 2015.

GRIBEL, R.; HAY, J. D. Pollination ecology of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) in Central Brazil cerrado vegetation. **Jornal Tropical Ecology**, v. 9, p. 199-211, 1993.

HUGGETT J, DHEDA K, BUSTIN S, ZUMLA A (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes Immun** 6:279–284.

INVITROGEN, manual e procedimento disponíveis em [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/trizol\\_reagent.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf). Acesso em: 27 de agosto de 2017.

LIMA, M, L: Conceitos básicos de técnicas em biologia molecular. **Embrapa**, v. 1, p. 9-11.

LOGEMANN, J.; SCHELL, J.; WILLMITZER, L. Improved method for isolation of RNA from plant tissue. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 163, n. 1, p. 16- 20, 1987.

LOPES, L. S.; GALLÃO, M. I.; BERTINI, C. H. C. M. Mobilization of reserves during germination of *Jatropha* seeds. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 44, n. 2, p. 371-378, abr./jun. 2013.

MAROUFI A, BOCKSTAELE EV, LOOSE MD (2010) Validation of reference genes for gene expression analysis in chicory (*Cichorium intybus*) using quantitative real-time PCR. **BMC Mol Biol** 11: 15–27.

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

MITRA D AND KOOTSTRA A (1993). Isolation of RNA from apple skin. **Plant Mol. Biol. Rep.** 11: 326-332.

NAVES, R.V. **Espécies frutíferas nativas dos cerrados de Goiás: caracterização e influências do clima e dos solos**. 1999. 206p. Tese (Doutorado em Agronomia: Produção vegetal) – Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1999.

NICOT N, HAUSMAN JF, HOFFMANN L, EVERS D (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. **J Exp Bot** 56: 2907–2914.N.

OLIVEIRA, M. E. B. et al. Aspectos agronômicos e de qualidade do pequi. Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2008. 32 p.

PIERCE, A. BEIJAMIN. **Genética um enfoque conceitual** v3, n 3, p. 332 – 333, 2009.

RODRIGUES, V. I. **Estrutura e germinação de sementes de pequi antes e após a dispersão**. Montes Claros, 2017.

SANTOS, H, O. 2016. 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

SAMBROOK, J.; RUSSEL., D. W. 2001. **Molecular cloning - a laboratory manual**. 3. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.

SALZMAN RA, FUJITA T, ZHU-SALZMAN K, HASEGAWA PM, et al. (1999).An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. **Plant Mol. Biol. Rep.**17: 11-17.

SHARMA, A. D.; GILL, P. K.; SINGH, P. 2003. RNA isolation from plant tissues rich in polysaccharides. **Analytical Biochemistry**, Bethesda, v.314, p.319-321.

SCHERRER, K.; DARNELL, J. E. Sedimentation characteristics of rapidly labeled RNA from He Lacells. **Biochemistry and Biophysichal Research Communication**, v. 7, p. 486-490, 1962.

THELLIN O, ELMOUALIJ B, HEINEN E, ZORZI W A decade of improvements in quantification of gene expression and internal standard selection. **Biotechno**, 2009.

VANDESOMPELE J, DE PRETER K, PATTYN F, POPPE B, VAN ROY N, et al. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol** 3: 1–11.J.

ZENG Y AND YANG T (2002). RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. **Plant Mol. Biol. Rep.** 20: 417.

