

---

**ECOLOGIA**

---

**Marianna de Castro Sá**

**Otimização de protocolo de extração de RNA  
para transcriptoma da chuva de sementes de  
plantas nativas**



Rio Claro - SP  
2025

Marianna de Castro Sá

**Otimização de protocolo de extração de RNA para transcriptoma da  
chuva de sementes de plantas nativas**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita  
Filho”, para obtenção do grau de Ecóloga.

Orientador(a): Natacha Silva

Coorientador(a): Prof. Dra. Marina Côrrea Côrtes

Rio Claro - SP  
2025

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| C355o | <p>Castro Sá, Marianna</p> <p>Otimização de protocolo de extração de RNA para transcriptoma da chuva de sementes de plantas nativas / Marianna Castro Sá. -- Rio Claro, 2025</p> <p>46 p. : tabs., fotos</p> <p>Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ecologia) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro</p> <p>Orientadora: Natacha Silva</p> <p>Coorientadora: Marina Côrrea Côrtes</p> <p>1. Molecular. 2. Genética. 3. RNA. 4. Trânsriptoma. I. Título.</p> |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

MARIANNA DE CASTRO SÁ

**OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE RNA PARA  
TRANSCRIPTOMA DA CHUVA DE SEMENTES DE PLANTAS  
NATIVAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita  
Filho”, para obtenção do grau Ecóloga

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Natacha Silva

Mestre Felipe Aoki Golçalves

Mestre Carina Isabella Motta

Aprovado em: 07 de novembro de 2025

Assinatura do discente

Assinatura do(a) orientador(a)

Assinatura do(a) coorientador(a)

*A ecologia,  
eu dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiro devo agradecer a Dra. Prof. Marina Correa Cortes, que me acolheu e me direcionou dentro do laboratório de Ecologia Molecular, onde aprendi e evolui, descobrindo aquilo que amo fazer. Especialmente, obrigada a minha orientadora Natacha Silva, que esteve comigo desde o primeiro dia e, além de orientadora, se tornou uma amiga e inspiração de vida, dando exemplo de como ser uma profissional que não desiste e uma pessoa acolhedora.

Obrigada aos Departamentos de Ecologia e ao Departamento de Botânica pelo o espaço e apoio. Obrigada aos companheiros do RESEED pelos momentos compartilhados dentro e fora do projeto. Agradeço também ao projeto NSF, à FAPESP e à COPE Conecta pelos fundos da pesquisa.

Aqueles que estiveram comigo desde o início. Marina, João, Douglas, Ana Julia, Rafaela e Laura, estes que fizeram o caminho da graduação ser mais leve com todos os sorrisos e momentos inesquecíveis. Gabriela e Ester, que dividiram um lar comigo e me ajudaram em todas as minhas “primeiras vezes” dentro do meio acadêmico. A minha veterana de curso, Sofia, que foi, e ainda é, um dos meus maiores apoios.

À república Dungas, que me acolheu nos últimos anos de minha graduação e fizeram eu me sentir em casa. Sempre no meu coração.

Aos meus queridos amigos de Piracicaba que, mesmo à distância, nunca duvidaram de mim e sempre me apoiaram. Um obrigado especial a Isabela, que me acompanha desde o ensino fundamental e agora está sendo citada no meu trabalho de conclusão de curso; e outro agradecimento especial para o Raphael, que foi uma das primeiras pessoas que me encorajou a entrar no curso e escutar meu coração.

Embora não consiga citar todos que contribuíram neste caminho, sou imensamente grata a todas as pessoas que, de alguma forma, estiveram presentes e me apoiaram ao longo da graduação. Seja na forma de uma amiga que, como monitora, teve paciência em me ajudar em uma disciplina difícil, de um amigo que me ofereceu um abraço ou um doce em um momento de cansaço, ou ainda de alguém especial que me lembrou que eu seria capaz de chegar até aqui. Cada gesto de incentivo e carinho fez diferença.

Indispensavelmente quero agradecer aos meus pais, que me deram força, todo o tipo de apoio possível e nunca duvidaram de mim. Eu sou quem eu sou graças a

vocês e sempre serei grata por isso. Eu amo vocês incondicionalmente. Obrigada aos meus dois irmãos que, mesmo de longe, me incentivaram, apoiaram e me fizeram rir no meio do processo. Por fim, mas não menos importante, sou grata ao meu gatinho, Dobby, que sempre me deu forças (e um sorriso) apenas de olhar uma foto dele.

## RESUMO

O isolamento de RNA (Ácido Ribonucleico) de alta qualidade é requisito básico para construção de transcriptomas. Porém, a boa extração de RNA vegetal é desafiadora, pois as plantas são ricas em metabólitos secundários, afetando a integridade e pureza do RNA, que é uma molécula instável. A falta de estudos e especificações sobre extração de RNA em plantas silvestres representa uma lacuna na construção de transcriptoma, que limita a nossa compreensão dos processos genéticos e a base molecular de fenótipos. Portanto, isolar o RNA de folhas demanda ajustes nos protocolos, exigindo procedimentos específicos para cada espécie. Os objetivos da pesquisa foram otimizar o protocolo de isolamento de RNA de folhas de plantas nativas da Mata Atlântica com frutos consumidos e dispersos por aves e obter RNA íntegro e puro para sequenciamento transcriptômico. Foram coletadas folhas de cinco indivíduos das espécies *Allophylus edulis*, *Cupania vernalis*, *Guarea kunthiana*, *Lacistema hasslerianum*, *Pera glabrata* e *Schinus terebinthifolia*, em fragmentos de Mata Atlântica, em Paranapanema/SP. Para as extrações e purificações de RNA, foram utilizados quatro protocolos de extração. As extrações foram quantificadas em Nanodrop (ng/μL) e validadas quanto à integridade das amostras por RIN (RNA Integrity Number) e enviadas para a construção de transcriptoma. As espécies *P. glabrata* ( $\bar{x}$ : 176,04 ng/μL e 6.44 de RIN), *G. kunthiana* ( $\bar{x}$  55,26 ng/μL e 5.72 de RIN), *C. vernalis* ( $\bar{x}$  44,68 ng/μL e 6.54 de RIN), *L. hasslerianum* ( $\bar{x}$ : 55,26 ng/μL de 6.16 de RIN) e *A. edulis* ( $\bar{x}$  148,68 ng/μL e 6.52 de RIN ) apresentaram bons resultados de quantidades e integridades com as adaptações de protocolos realizados, aptos para a montagem dos transcriptomas. A espécie *S. terebinthifolia* não obteve pureza ou quantidade suficientes para a construção de transcriptoma. Ainda assim, muitas espécies nativas precisam de mudanças específicas no protocolo devido suas especificidades metabólicas.

**Palavras-chave:** Molecular; Genoma; Dispersão de sementes; Purificação.



## ABSTRACT

The isolation of high-quality RNA (Ribonucleic Acid) is a basic requirement for transcriptome assembly. However, plant RNA extraction is challenging, since plants are rich in secondary metabolites, which affect the integrity and purity of RNA, an inherently unstable molecule. The lack of studies and specifications on RNA extraction in wild plants represents a gap in transcriptome construction, limiting our understanding of genetic processes and the molecular basis of phenotypes. Therefore, isolating RNA from leaves requires adjustments to protocols, demanding specific procedures for each species. The objectives of this research were to optimize the RNA isolation protocol from leaves of native Atlantic Forest plants with fruits consumed and dispersed by birds, and to obtain intact and pure RNA for transcriptome sequencing. Leaves were collected from five individuals of the species *Allophylus edulis*, *Cupania vernalis*, *Guarea kunthiana*, *Lacistema hasslerianum*, *Pera glabrata*, and *Schinus terebinthifolia* in fragments of Atlantic Forest in Paranapanema/SP. For RNA extractions and purifications, four extraction protocols were used. Extractions were quantified in Nanodrop (ng/μL) and validated for sample integrity by RIN (RNA Integrity Number), then sent for transcriptome construction. The species *P. glabrata* ( $\bar{x}$ : 176.04 ng/μL and 6.44 RIN), *G. kunthiana* ( $\bar{x}$ : 55.26 ng/μL and 5.72 RIN), *C. vernalis* ( $\bar{x}$ : 44.68 ng/μL and 6.54 RIN), *L. hasslerianum* ( $\bar{x}$ : 55.26 ng/μL and 6.16 RIN), and *A. edulis* ( $\bar{x}$ : 148.68 ng/μL and 6.52 RIN) showed good results in terms of quantity and integrity with the adapted protocols, being suitable for transcriptome assembly. The species *S. terebinthifolia* did not yield sufficient purity or quantity for transcriptome construction. Nevertheless, many native species still require specific adjustments to protocols due to their metabolic particularities.

**Keywords:** Molecular; Genome; Seed dispersal; Purification.

**Title in english:** Optimization of RNA extraction protocol for transcriptome analysis of the seed rain of native plants.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Indivíduo de <i>Pera glabrata</i> .....                                                                                                           | 7  |
| Figura 2: Indivíduo de <i>Allophylus edulis</i> .....                                                                                                       | 8  |
| Figura 3: Indivíduo de <i>Guarea kunthiana</i> .....                                                                                                        | 8  |
| Figura 4: Indivíduo de <i>Schinus terebinthifolia</i> .....                                                                                                 | 9  |
| Figura 5: Indivíduo de <i>Lacistema hasslerianum</i> .....                                                                                                  | 10 |
| Figura 6: Indivíduo de <i>Cupanea vernalis</i> .....                                                                                                        | 10 |
| Figura 7: Análise de gel de eletroforese de <i>A. edulis</i> , <i>C. vernalis</i> , <i>G. kunthiana</i> , <i>L. hasslerianum</i> , <i>P. glabrata</i> ..... | 26 |
| Figura 8: Integridade do RNA isolado dos indivíduos de <i>Allophylus edulis</i> .....                                                                       | 27 |
| Figura 9: Integridade do RNA isolado dos indivíduos de <i>Cupanea vernalis</i> .....                                                                        | 28 |
| Figura 10: Integridade do RNA isolado dos indivíduos de <i>Guarea kunthiana</i> .....                                                                       | 30 |
| Figura 11: Integridade do RNA isolado dos indivíduos de <i>Lacistema hasslerianum</i> .....                                                                 | 31 |
| Figura 12: Integridade do RNA isolado dos indivíduos de <i>Pera glabrata</i> .....                                                                          | 33 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Quantidade de ng/ $\mu$ L de RNA nos indivíduos de cada espécie.....        | 24 |
| Tabela 2: Relações entre as absorbâncias 260/280 dos indivíduos de cada espécie ..... | 25 |
| Tabela 3: Fastqc da espécie <i>Allophylus edulis</i> .....                            | 36 |
| Tabela 4: Fastqc da espécie <i>Cupania vernalis</i> .....                             | 36 |
| Tabela 5: Fastqc da espécie <i>Guarea kunthiana</i> .....                             | 36 |
| Tabela 6: Fastqc da espécie <i>Lacistema hasslerianum</i> .....                       | 36 |
| Tabela 7: Fastqc da espécie <i>Pera glabrata</i> .....                                | 36 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|             |                                                      |
|-------------|------------------------------------------------------|
| <b>cDNA</b> | complementary DNA (DNA complementar).                |
| <b>RNA</b>  | Rinocubleic Acid (Ácido Ribonucleico).               |
| <b>RIN</b>  | RNA Integrity Number (Número de Integridade do RNA). |

## SUMÁRIO

|                                                                                                    |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                          | <b>3</b>  |
| <b>2 OBJETIVOS .....</b>                                                                           | <b>6</b>  |
| <b>2.1 Objetivos específicos.....</b>                                                              | <b>6</b>  |
| <b>3 DESENVOLVIMENTO OU METODOLOGIA .....</b>                                                      | <b>7</b>  |
| <b>3.1 Espécies de estudos .....</b>                                                               | <b>7</b>  |
| <b>3.2 Material vegetal e local de coleta.....</b>                                                 | <b>11</b> |
| <b>3.3 Germinação de sementes para extração de RNA .....</b>                                       | <b>11</b> |
| <b>3.4 Métodos de extração.....</b>                                                                | <b>12</b> |
| <b>3.4.1 Kit Quick-RNA™ Plant Miniprep (Zymo Research).....</b>                                    | <b>12</b> |
| <b>3.4.2 Kit Quick-RNA™ Miniprep (Zymo Research) .....</b>                                         | <b>13</b> |
| <b>3.4.3 Rneasy Plant Mini Kit (Qiagen).....</b>                                                   | <b>14</b> |
| <b>3.4.4 Protocolo adaptado de Wani et al. 2022 .....</b>                                          | <b>14</b> |
| <b>3.4.5 Protocolo de Wacker e Godard 2005 .....</b>                                               | <b>16</b> |
| <b>3.4.6 Análise de dados .....</b>                                                                | <b>17</b> |
| <b>3.4.7 Sequenciamento de transcriptoma.....</b>                                                  | <b>17</b> |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                              | <b>19</b> |
| <b>4.1 Controle de contaminação no ambiente de extração de RNA.....</b>                            | <b>19</b> |
| <b>4.2 Melhorias no protocolo do Kit Quick-RNA™ Plant Miniprep e Kit Quick-RNA™ Miniprep .....</b> | <b>19</b> |
| <b>4.3 Melhorias no protocolo do Kit Rneasy Plant Mini Kit (Qiagen) .....</b>                      | <b>20</b> |
| <b>4.4 Melhorias do Protocolo adaptado de Wani et al. 2022 .....</b>                               | <b>20</b> |
| <b>4.5 Melhorias do Protocolo adaptado de Wacker e Godard 2005 .....</b>                           | <b>21</b> |
| <b>4.6 Análise de Integridade e Pureza.....</b>                                                    | <b>21</b> |
| <b>4.7 Montagem de novo e qualidade dos transcriptomas .....</b>                                   | <b>35</b> |
| <b>5 CONCLUSÃO .....</b>                                                                           | <b>38</b> |
| <b>6 REFERÊNCIAS.....</b>                                                                          | <b>39</b> |
| <b>MATERIAL COMPLEMENTAR .....</b>                                                                 | <b>44</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A extração de RNA (Ácido Ribonucleico) é o passo primordial para a condução de pesquisas que abrangem análises transcriptômicas. Para alcançar resultados de alta confiabilidade e relevância na extração de RNA, é necessária a purificação dessas moléculas. Sua integridade molecular e pureza devem ser assegurador, que são fundamentais para a precisão dos dados obtidos. Entretanto, a principal complexidade nas extrações de RNA reside na garantia de sua integridade, visto que se trata de uma molécula instável. O RNA é formado por uma longa cadeia não ramificada de fita única composta por ribonucleotídeos, os quais são formados por uma ribose (açúcar), um fosfato e as bases nitrogenadas, unidas entre si por uma ligação fosfodiéster (BASTOS et al., 2016).

As plantas nativas podem exibir uma abundância de compostos fenólicos e polissacarídeos, o que pode representar um desafio na obtenção de material de RNA com a qualidade e quantidade necessárias para análises moleculares precisas (CRISTINA; FRAGOSO; SANTOS; GOMES, 2010). Os compostos secundários apresentam uma ampla variação em quantidade e qualidade nos vegetais, o que demanda a utilização de métodos específicos para o isolamento de RNA (CHANG et al., 1993; MITRA AND KOOTSTRA, 1993; SALZMAN et al., 1999; ZENG AND YANG, 2002; GESTEIRA et al., 2003; GASIC et al., 2004). Com isso, protocolos especializados devem ser desenvolvidos para esses tecidos vegetais com especificidades para cada espécie desejada, para que haja um bom sequenciamento de transcriptomas (DING et al 2008., LAL et al. 2001).

As análises de transcriptomas são fundamentais para catalogar todos os transcritos presentes em um tecido ou organismo; determinar a estrutura dos genes; e quantificar os níveis de expressão gênica (MAROZONA, MARRA, 2008). Esses dados permitem compreender como espécies vegetais regulam processos fisiológicos essenciais, como produção de metabólitos de defesa, formação de frutos e maturação de sementes. Avanços em genética e biologia molecular ampliaram esse cenário por meio de técnicas como a qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction), que consiste em uma reação de PCR em tempo real capaz de quantificar com alta precisão os níveis de expressão de genes específicos, permitindo validar resultados obtidos por análises de transcriptoma (GARCIA, 1995).

A transcriptômica é uma ferramenta muito útil para estudar processos relacionados à dispersão de sementes e, para tal, refinar técnicas de isolamento de

RNA é fundamenta. Primeiramente, o processo de dispersão de sementes é considerado um dos fatores mais importantes que afetam o recrutamento de plantas, a distribuição espacial e a viabilidade a longo prazo das populações (ASQUITH, 1999; SILVA, 2001). O papel de um animal como dispersor de uma planta está ligado à sua eficiência em transportar sementes, ao tratamento dado a estas e à deposição em locais adequados (MCKEY, 1975; SCHUPP, 1993). As aves são os principais dispersores de sementes, devido a quantidade de espécies incluem frutos em sua dieta (GALLETI, PIZZO, 2010). A mobilidade desses animais também permite que levem sementes a distâncias seguras, além de explorar ambientes diversificados (GALLETI, PIZZO, 2010).

Estudos sobre a chuva de sementes tem se mostrado fundamentais, uma vez que a dinâmica da sucessão ecológica, a sobrevivência ou recuperação de um ecossistema, são determinadas tanto pela entrada de sementes quanto pelo recrutamento de novas plantas, cujo êxito é influenciado pela variedade da chuva de sementes e pela composição florística da região (WHILLEMS, BIK, 1998). A formação de sementes e frutos são fatores que influenciam a frugivoria e dispersão. Por exemplo, o aumento da gliconeogênese e da hidrólise dos polissacarídeos resultam o gosto dos frutos (PRASANNA et al. 2007), enquanto o aroma é produzido por uma mistura de compostos voláteis e a degradação de flavonóides (DEFILIPPI et al. 2009). Esses fatores podem ser compreendidos com os estudos de transcriptoma que buscam entender seus mecanismos moleculares.

Dessa forma, estudos transcriptômicos e ecológicos se complementam: ao mesmo tempo em que a análise de transcriptoma revela os mecanismos genéticos e moleculares relacionados à produção e qualidade das sementes, os estudos de dispersão mostram como esses propágulos alcançam áreas adequadas para germinar e manter populações viáveis. A integração desses conhecimentos fortalece estratégias de conservação, unindo a compreensão da regulação gênica ao papel dos dispersores na manutenção da diversidade e da resiliência de florestas tropicais.

A falta de estudos sobre extração de RNA em plantas nativas representa uma lacuna crucial na construção de transcriptomas. Essa carência limita nossa compreensão dos processos genéticos dessas espécies fundamentais nos ecossistemas naturais, além da dificuldade na identificação de genes e a compreensão de sua ecologia molecular. Além disso, isolar o RNA desses tecidos

demanda ajustes nos protocolos usuais, exigindo o desenvolvimento de procedimentos específicos para cada tipo de tecido e espécie.

Durante as extrações, o foco principal foi otimizar o protocolo de extração de RNA, com o objetivo de obter amostras de alta qualidade e representatividade molecular. Essa iniciativa não apenas aprimorará nosso entendimento das características genômicas, moleculares e ecológicas dessas espécies, mas também facilitará pesquisas futuras, abrindo caminho para novas descobertas e aplicações na conservação da biodiversidade vegetal da Mata Atlântica, atualmente sendo um dos ecossistemas mais ameaçados do planeta (BROWN, 1992., TERBORGH, 1992).

Esse trabalho faz parte de um Treinamento Técnico intitulado “Isolamento de RNA da chuva de sementes de seis espécies de plantas dispersas por animais em áreas experimentais de regeneração florestal”, vinculado ao processo número 2020/02943-6 - NSF Dimensions of Biodiversity - BIOTA - Projeto de Pesquisa - Temático, chefiado pela pesquisadora Profa. Dra. Marina Corrêa Côrtes.



## **2 OBJETIVOS**

O **objetivo geral** do projeto é otimizar os protocolos de extração de RNA de seis espécies de plantas nativas da Mata Atlântica, alcançando resultados satisfatórios para auxiliar outros possíveis estudos.

### **2.1 Objetivos específicos**

1. Obter RNA com valores de integridade e pureza adequados para sequenciamento transcriptômico.
2. Comparar o sucesso da extração entre seis espécies de árvores nativas da Mata Atlântica.

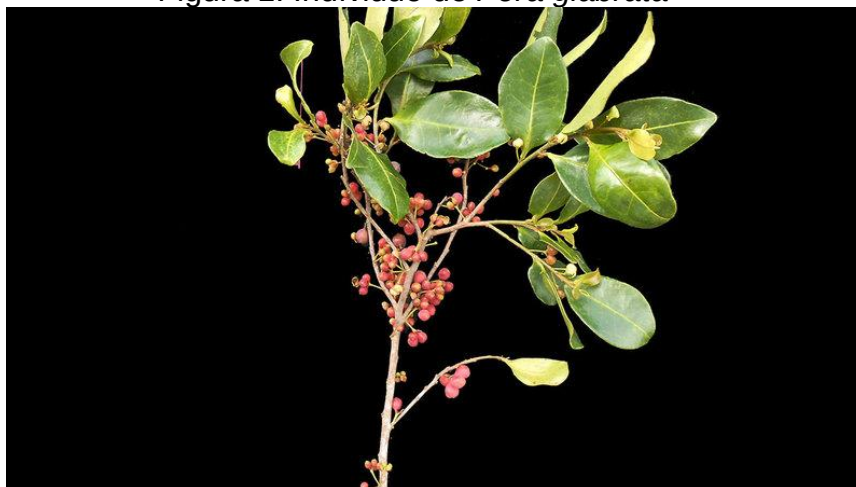
### 3 DESENVOLVIMENTO OU METODOLOGIA

#### 3.1 Espécies de estudos

##### a. *Pera glabrata*

A espécie *Pera glabrata* (Peraceae), popularmente conhecida como “tamanqueira”, apresenta uma ampla distribuição, registrada nos estados de Pernambuco, Minas Gerais, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná. É comumente observada em formações vegetais mais secas, como restinga e cerrado (PEREIRA; GOMES, 1994; ASSUMPÇÃO; NASCIMENTO, 2000; GOMES et al., 2004; PINTO et al., 2005; SILVA et al., 2008), mas também é observada em matas de galeria e florestas decíduas da Mata Atlântica (LORENZI, 1998). Espécies como *Turdus leucomelas* (Tardidae), *Colaptes melanochloros* (Picidae) e *Dacnis cayana* (Thraupidae) estão entre os principais dispersores da espécie (FRANCISCO, LUNARDI, GALETTI, 2005).

Figura 1: Indivíduo de *Pera glabrata*



Fonte: Programa Arboretum

##### b. *Allophylus edulis*

Também conhecida como “cocum”, “vacum” ou “fruto do pombo”, *Allophylus edulis* (Sapindaceae) é uma planta nativa do Brasil, da Mata Atlântica, que também é encontrada na Argentina, Bolívia, Uruguai e nas Guianas (DÍAZ et al., 2014), sendo uma das espécies de sua família com uma das distribuições geográficas mais amplas (CORDEIRO; RODRIGUES, 2007). Suas sementes têm uma extensa aplicação na restauração ambiental de florestas estacionais decidual e ombrófila mista, por

desempenhar funções importantes em tais formações vegetais (HACK et al., 2005), visto que a plantação desta espécie é recomendada para acelerar a restauração florestal devido ao seu rápido crescimento e à grande quantidade de frutas que atraem dispersores (TURCHETTO et al., 2017).

Figura 2: Indivíduo de *Allophylus edulis*



Fonte: Programa Arboretum

c. *Guarea kunthiana*

Também conhecida como jatuauba, figo-do-mato, peloteira, e jitó, a *Guarea kunthiana* (Meliaceae) tem uma ampla distribuição geográfica no Brasil (LORENZI, 2009), presente na Mata Atlântica e também em quase todas as formações florestais até 2000m de altitude, com exceção do cerrado (LORENZI, 2002). Seus frutos servem de alimento para tucanos, sabiás e outras espécies da avifauna (WHEELWRIGHT et al., 1984). Além disso, a espécie também é indicadora de terras férteis (KLEIN, 1984).

Figura 3: Indivíduo de *Guarea kunthiana*



Fonte: Programa Arboretum

d. *Schinus terebinthifolia*

A maioria das espécies pertencentes ao gênero *Schinus* é encontrada predominantemente na América do Sul (MACHADO et al., 2017), assim como a *Schinus terebinthifolia* (Anacardiaceae), comumente conhecida como aroeira. Possui uma ampla distribuição no território brasileiro, sobretudo na Mata Atlântica (WHEELER et al., 2007). A sua floração ocorre de maneira sincronizada, sempre nos meses de outono (EWEL et al., 1982), e sua frutificação e a dispersão de sementes ocorrem ao longo dos meses de inverno. Famílias de aves como Mimidae e Turdídeo realizam uma alta taxa de dispersão de semente da *Schinus terebinthifolia*.

Figura 4: Indivíduo de *Schinus terebinthifolia*



Fonte: Programa Arboretum

e. *Lacistema hasslerianum*

Pertencente a família Lacistemataceae e é conhecida como Gurugava, é geralmente encontrada em regiões de floresta de Mata Atlântica e cerrado, em baixas altitudes e sua distribuição vai da região Centro-Oeste até o Sul do Brasil (SLEUMES, 2004). É uma espécie pioneira, heliófita, que ocorre no sub-bosque ou em locais mais abertos em cerrado, cerradão, floresta estacional semidecidual e mata ciliar (DURIGAN, 2004; WANDERLEY, 2005; LORENZI, 2009). A estratégia de consumo dos frutos onde os visitantes acabam ingerindo as sementes junto da polpa, implica numa maior probabilidade de dispersão da semente da espécie (SCHUPP, 1993). A família Pripidae é uma das principais dispersoras da espécie.

Figura 5: Indivíduo de *Lacistema hasslerianum*



Fonte: Programa Arboretum

*f. Cupanea vernalis*

Comumente conhecida como camboatã ou arco-de-peneira, ocorre tanto em floresta semidecídua de altitude primária quanto secundária em Mata Atlântica (LORENZI, 1992). Apresenta importância ecológica, pois seus frutos são muito usados como alimentos para a avifauna (LORENZI, 2002). Possui grande potencial para uso em plantios mistos, destinados à recomposição de áreas degradadas e de preservação (LORENZI, 2000). Em alguns locais que foi estudada, sua frutificação ocorreu em meses úmidos e quentes (MORELLATO, 1992).

Figura 6: Indivíduo de *Cupanea vernalis*



Fonte: Programa Arboretum

### 3.2 Material vegetal e local de coleta

Folhas de indivíduos adultos das espécies *Pera glabrata*, *Allophylus edulis*, *Guarea kunthiana*, *Schinus terebinthifolia*, *Lacistema hasslerianum* e *Cupania vernalis*, foram coletadas para a realização dos testes de extração de RNA. As seis espécies estavam localizadas em fragmentos da Mata Atlântica na região de Paranapanema, São Paulo, Brasil, onde predomina vegetação de Floresta Estacional Semidecidual, situada numa região de interface entre várias formações vegetais que ocorrem no Estado de São Paulo. Essas espécies foram selecionadas devido ao papel crucial de seus frutos, que são consumidos e dispersos por aves, facilitando a regeneração das florestas.

Entre os cinco indivíduos, de cada espécie, e seus pontos de coletas, a distância média entre eles são: entre os indivíduos de *Pera glabrata*, a média de distância foi dado por 9,82 km; entre os indivíduos de *Allophylus edulis*, a média de distância foi 2,62 km; entre os indivíduos de *Guarea kunthiana*, a média de distância é 2,75 km; entre os indivíduos de *Schinus terebinthifolia*, a média de distância estabelecida foi de 3,8 km; entre os indivíduos de *Cupania vernalis*, a média de distância é 4,57 km; e, por fim, entre os indivíduos de *Lacistema hasslerianum*, a média de distância foi 9,07 km.

### 3.3 Germinação de sementes para extração de RNA

Durante o processo de extração de RNA da espécie *S. terebinthifolia* foram observadas observadas baixa quantidade e pureza insatisfatória de RNA nas folhas de indivíduos adultos coletados em campo. Para investigar possíveis variações na quantidade e na qualidade do RNA extraído de folhas de diferentes estágios das plantas, testamos a extração de RNA a partir de plântulas de *S. terebinthifolia*.

As sementes de *S. terebinthifolia* foram primeiramente coletadas em coletores de sementes dispostos nos fragmentos florestais da área de estudo. A cada 15 dias foram realizadas as germinações dessas sementes, no decorrer de todos os meses do ano de 2024. As sementes eram levadas para o laboratório do departamento de Biologia Vegetal da Unesp de Rio Claro - SP para o processo de germinação. As sementes eram limpas com hipoclorito 10% para garantir a remoção de possíveis contaminantes. Em seguida, as sementes foram colocadas em Gerbox (caixa plástica transparente com tampa para germinação) contendo vermiculita. Depois colocadas

em fotoperíodo de 24h em condições de iluminação contínua, com temperatura de 25 °C, em BOD (incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio), para a germinação.

Após 15 dias de germinação, quando as duas primeiras folhas verdadeiras emergiam, as plântulas foram transferidas para sacos de mudas contendo terra vegetal, proporcionando um ambiente adequado para o crescimento. Aproximadamente após quatro meses de desenvolvimento, as plantas foram selecionadas para coleta de folhas para os testes de extração de RNA.

### **3.4 Métodos de extração**

Foram testados cinco protocolos de extração de RNA usando kits comerciais e procedimentos manuais. Esses kits são comumente utilizados para a extração de RNA de tecidos vegetais e se diferem em algumas etapas, como a quebra do material, remoção de inibidores e o tempo que o processo de extração leva.

#### **3.4.1 Kit Quick-RNA™ Plant Miniprep (Zymo Research)**

##### **Lise**

(1) Foram transferidos 150mg do material vegetal congelado, previamente macerado, num tubo de 2 ml com esferas de cerâmica.

(2) Adicionou-se 800 µL do RNA Lysis Buffer e o tubo foi homogeneizado no mini bead (bead beater) por 5 minutos.

(3) Após a homogeneização, centrifugou-se o tubo por 1 minuto.

##### **Precipitação**

(4) O sobrenadante foi transferido para uma Coluna Zymo-Spin™ IIICG em um tubo de coleta e centrifugado.

(5) Adicionou-se um volume igual ao da solução de álcool etanol 95 -100%.

(6) Colocou-se essa mistura na coluna Zymo-Spin™ IICR, centrifugou-se e o filtrado foi descartado.

##### **Purificação**

(7) Adicionou-se 400 µL de RNA Prep Buffer, centrifugou-se e o filtrado foi descartado. Em seguida, aplicaram-se 700 µL de RNA Wash Buffer e novamente centrifugou-se.

(8) A última lavagem foi realizada com 400 µL de RNA Wash Buffer, seguida de centrifugação por 1 minuto.

(9) A coluna do filtro foi transferida para um tubo novo e adicionou-se 50 µL de DNase/RNase - Free Water na coluna e centrifugou-se para recuperar o RNA.

(10) Foi colocado no Zymo-Spin IIIRC Filter e foi inserido 600 µL de Prep Solution.

(11) Centrifugou-se a amostras por 3 minutos a 8000 xg.

### **3.4.2 Kit Quick-RNA™ Miniprep (Zymo Research)**

#### **Lise**

(1) Os buffers foram preparados, adicionando-se 96 mL de etanol absoluto (ou 104 mL de etanol 95%) a 24 ml do RNA Wash Buffer (para kits de 50 preparações); ou 192 ml de etanol absoluto (ou 208 ml de etanol 95%) ao RNA Wash Buffer (para kits de 200 preparações).

(2) Adicionou-se 600 µL de RNA Lysis Buffer e foi homogenizado por mini beade (bead beating) e foi centrifugação.

(3) A lise foi transferida para um filtro Spin-Away™ em um tubo e centrifugado.

#### **Precipitação**

(4) O líquido que passa pela coluna foi coletado e, em seguida, foi adicionado um volume igual de etanol (95 -100%) ao filtrado.

(5) A mistura foi transferida para a coluna Zymo-Spin™ IIICG acoplada a um novo tubo e centrifugou-se. O filtrado foi descartado.

#### **Purificação**

(6) A coluna foi lavada com 400 µL de RNA Wash Buffer, centrifugado e o líquido foi descartado.

(7) 5 µL de DNase I e 75 µL de DNA Digestion Buffer foram preparadas, misturadas e adicionadas na coluna. A mistura foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente.

(8) 400 µL de RNA Prep Buffer foi adicionada à coluna, centrifugou-se e o líquido foi descartado. Em seguida, foram feitas duas lavagens: 700 µL de RNA Wash Buffer e a segunda com 400 µL do mesmo tampão, e foi centrifugado por 1 minuto na última lavagem.

(9) A coluna foi transferida para um tubo limpo livre de RNase.

(10) Adicionou-se 100 µL de DNase/RNase – Free Water diretamente sobre no filtro e centrifugou-se.



### 3.4.3 Rneasy Plant Mini Kit (Qiagen)

#### Lise

(1) Adicionou-se 10  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol ou 20  $\mu$ L de ditioneitol 2 M a cada 1 ml de Buffer RLT ou RLC; adicionou-se quatro volumes de etanol (96–100%) ao Buffer RPE. Foi utilizado no máximo 100 mg de material.

(2) O tecido vegetal foi colocado em nitrogênio líquido e triturado até se obter um pó. Após maceração, o material foi transferido para um tubo de 2 ml resfriado ao nitrogênio líquido.

(3) Foi adicionado 450  $\mu$ L do Buffer RLT ou RLC, seguidamente foi colocado no vórtex.

(4) O lisado foi transferido para a coluna QIAshredder em um tubo de 2 ml e centrifugado por 2 minutos em velocidade máxima. O filtrado foi transferido para um novo tubo, evitando contato com o pallet.

#### Precipitação

(5) Em seguida, foi adicionado meio volume de etanol (96–100%) ao lisado, misturando apenas com a pipetagem.

(6) A amostra foi transferida para a coluna RNeasy Mini em um tubo de 2 ml e centrifugada por 15 segundos a  $\geq 8.000 \times g$ . O filtrado foi descartado.

#### Purificação

(7) Adicionou-se 700  $\mu$ L do Buffer RW1 à coluna e é centrifugado por 15 segundos. O filtrado é descartado.

(8) Duas lavagens com o Buffer RPE foram feitas: a primeira com 500  $\mu$ L, centrifugando por 15 segundos, e a segunda com 500  $\mu$ L, centrifugando por 2 minutos a  $\geq 8.000 \times g$ . Foi opcional a transferência da coluna para um novo tubo, com centrifugação em velocidade máxima por 1 minuto.

(9) A coluna foi colocada em um novo tubo de 1,5 ml, seguido de adição de 30–50  $\mu$ L de RNase – Free Water na coluna, e então centrifugado por 1 minuto a  $\geq 8.000 \times g$ .

(10) Se for necessário maior rendimento, a eluição pode ser repetida com mais 30 - 50  $\mu$ L de Free Water.

### 3.4.4 Protocolo adaptado de Wani et al. 2022

#### Lise

(1) Foi posto 50 mg da amostra em um tubo de 1.5 ml, juntamente com as esferas de cerâmica e 1 ml de acetona.

(2) Seguidamente, a amostra foi submetida mini bead (bead beater) por 3 minutos.

(3) A amostra foi lavada mais uma vez com 1 ml de acetona 100% e centrifugada por 5 minutos em 10.360 rpm e, após centrifugação, a acetona deve ser descartada.

(4) 500 µL do PVP e 200 µL do B-Mercaptoetanol foram adicionados e misturados no vortex por 5 minutos.

(5) Seguidamente, a amostra foi incubada por 15 minutos. Logo em seguida, centrifugou-se por 10 minutos por 10.360 rpm. Foi formada o sobrenadante após centrifugação.

### **Precipitação**

(6) Transferiu-se para um novo tubo de 1.5 ml.

(7) Foi adicionado 300 µL do fenol clorofórmio e misturado no vortex por 2 minutos. Na sequência, centrifugou-se a amostra por 10 minutos por 10.360 rpm.

(8) Foram postos 20 µL do acetato de sódio.

(9) Foi inserido 500 µL do etanol, seguido de incubação por 1 hora a 4°C na geladeira e centrifugou-se por 10 minutos.

(10) A mistura foi descartada e 50 µL de Free Water devem ser adicionados. É necessário aguardar 5 minutos para dissolver o pallet formado no fundo do tubo.

(11) Adicionou-se 1 µL de DNase I.

(12) Foi inserio 300 µL de Free Water.

(13) Adicionou-se 200 µL de fenol clorofórmio.

(14) A mistura foi centrifugada por 5 minutos e o sobrenadante formado foi transferido para um novo tubo de 1.5 ml.

(15) Inseriu-se 30 µL do acetato de sódio e 750 µL do etanol e foram incubados a 4°C. A amostra foi centrifugada por 10 minutos e a mistura formada foi descartada.

(16) Inseriu-se 500 µL de LiCl e foi incubado por 1 hora no gelo dentro da geladeira. Novamente centrifugou-se por 10 minutos e a mistura descartada.

### **Purificação**

(17) A amostra foi lavada com 500ul de álcool 70%, e centrifugada por 5 minutos e descartar a mistura.

(18) Novamente foi lavado com 500ul de álcool 100% e centrifugada por 1 minuto e descartada.

(19) Foi colocada de cabeça para baixo por 10 minutos para a secagem e adicionado 50ul de RNase Free-Water.

### **3.4.5 Protocolo de Wacker e Godard 2005**

#### **Lise**

(1) 50g da amostra vegetal foi macerada no cadinho com nitrogênio líquido até virar pó e, seguidamente, passada para um tubo limpo.

(2) Foi adicionado 500 µL de Trizol. A amostra vegetal foi macerada no cadinho com nitrogênio líquido até virar pó e, seguidamente, passada para um tubo limpo.

(3) Inseriu-se 100 µL de PVP (4%).

(4) Adicionou-se 200 µL do B-Mercaptoetanol e colocado no vortex por 5 minutos.

(5) A amostra foi incubada fora de gelo por 15 minutos e centrifugada por 10 minutos.

#### **Precipitação**

(6) O sobrenadante formado foi passado para um novo tubo de 1.5 ml.

(7) Incluiu-se 300 µL de clorofórmio.

(8) A mistura foi colocada no vortex por 2 minutos e centrifugada por 10 minutos.

(9) Foi inserido 20 µL do acetato de sódio.

(10) Foi adicionado 500 µL do etanol na amostra e incubado por 1 hora a 4°C, seguido de centrifugação. A mistura foi descartada.

(11) Foi adicionado 500 µL de isopropanol e os tubos foram agitados por inversão e mantidos em temperatura ambiente por 8 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 10 minutos e foi formado o pellet. A mistura foi descartada.

(12) Incluiu-se 50 µL de Free Water e foi aguardado 5 minutos para dissolver.

(13) Adicionou-se 1 µL de DNase e as amostras foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente.

(14) A amostra foi lavada com 500 µL de álcool 70%, centrifugada por 5 minutos e a mistura descartada.

(15) Foi inserido 500  $\mu$ L de LiCl e incubada por 1 hora no gelo dentro da geladeira, seguido de centrifugação. A mistura foi descartada.

#### **Purificação**

(16) Foi lavada com 500  $\mu$ L de álcool 70% e centrifugada por 5 minutos. A mistura foi descartada.

(17) A amostra foi lavada novamente com 500  $\mu$ L de álcool 100% e centrifugada por 1 minuto.

(18) O tubo foi deixado de cabeça para baixo por 10 minutos para secagem.

(19) Foi inserido 50  $\mu$ L de RNase Free Water.

#### **3.4.6 Análise de dados**

Para comparação da eficácia de extração, as amostras foram submetidas à análise em Nanodrop (Thermo Scientific), obtendo-se os resultados das variáveis: (1) Pureza do RNA, que foi analisada pela razão entre as absorbâncias A260/280 de aproximadamente 2.0; com valores abaixo de 1.8 indicando contaminação por polissacarídeos, polifenóis e proteínas (Logemann et al., 1987; Manning, 1991); e (2) quantidade em ng/ $\mu$ L.

Além disso, após análise em Nanodrop, as amostras de RNA extraídos foram enviadas para o laboratório LaCTAD (Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida), na Universidade Estadual de Campinas (Campinas – SP). Foi medido também a qualidade do RNA, utilizando o parâmetro de RIN (RNA integrity number), com base na intensidade do rRNA 28S e 18S, em gel de agarose a 1,5%. Buscamos, utilizando um Agilent Bioanalyzer, um valor de RIN superior a 4.0, dado como um valor adequado para materiais de tecido vegetal.

#### **3.4.7 Sequenciamento de transcriptoma**

O sequenciamento das amostras de RNA de folhas das espécies em estudo, foi realizado no laboratório LaCTAD. O sequenciamento foi feito utilizando a plataforma NextSeq2000 (Illumina, USA), resultando em cerca de 30 milhões de leituras, correspondentes a aproximadamente 15 milhões de pares de 100 pb por amostra. Como não há genoma de referência disponível para as espécies em estudo, foi realizada uma montagem *de novo*.

Foram realizados os transcriptomas da folha dos cinco indivíduos de cada uma das espécies *P. glabrata*, *G. kunthiana*, *C. Vernalis*, *L. hasslerianum*. Foram construídos quatro transcriptomas de quatro indivíduos para a espécie *A. edulis*, devido uma maior dificuldade de extração para a espécie durante o projeto.

Para averiguar a qualidade do transcriptoma, os dados foram analisados em Fastqc (disponível em <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Com essa ferramenta, monitoramos principalmente: total de sequência, total de base (Gbp), comprimento da sequência e a %GC. Essa métricas foram selecionadas por apresentarem a quantidade, integridade e confiabilidade do sequenciamento.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Controle de contaminação no ambiente de extração de RNA

Para a extração, é necessária a higienização do ambiente de trabalho e dos instrumentos utilizados, os quais não devem conter RNAses (LEHMANN, KREIPE, 2001) nenhuma contaminação genética ou sujeiras externas. Nesta razão, todos os materiais foram devidamente limpos com o RNA Cleaner (Nova Biotecnologia), desde a bancada, centrífuga, hack, pilão, cadinho, pipetas, pinças e as caixas de ponteiras. Além disso, o RNA Cleaner (Nova Biotecnologia) foi usado durante todos os processos conforme necessário. (BECKSKEI, RAHAMAN, 2022)

A temperatura do ambiente de extração é importante para um bom rendimento. Temperaturas altas devem ser evitadas pela fragilidade das moléculas de RNA. Portanto, limitamos a temperatura ambiental a 19°C, além de realizar os procedimentos dentro de uma caixa térmica com gelo para as amostras se manterem resfriadas. Ademais, os reagentes utilizados foram previamente refrigerados em geladeira, assim como a centrífuga que foi previamente resfriada e mantida numa temperatura de 4°C. O tempo que a centrífuga leva para chegar na velocidade desejada também foi considerado, assim, adicionamos 45 segundos a cada ciclo por compensação.

### 4.2 Melhorias no protocolo do Kit Quick-RNA™ Plant Miniprep e Kit Quick-RNA™ Miniprep

As mudanças realizadas no protocolo do Kit Quick-RNA™ Plant Miniprep e Kit Quick-RNA™ Miniprep se assemelham por ambos serem da mesma marca comercial (Zymo Reserch). Nos dois protocolos, a quantidade de material de coleta foi ajustada para 50 mg, uma vez que o volume anterior resultava em vazamento da amostra do tubo utilizado. Para o tempo de centrifugação em etapas não especificadas, foi estabelecido um total de 30 segundos, com o objetivo de preservar o material genético da amostra. No passo (9), a quantidade de DNase/RNase - Free Water foi reduzida para 25 µL, para maximizar a concentração do material genético.

Esses kits foram utilizados para extração de RNA das espécies *P. glabrata*, *G. kunthiana*, *C. Vernalis*, *L. hasslerianum*, *A. edulis* e *S. terebinthifolius*.

### 4.3 Melhorias no protocolo do Kit Rneasy Plant Mini Kit (Qiagen)

A espécie *S. terebinthifolius* apresentou baixas quantidades de RNA e pureza insatisfatório (tabela suplementar 1), assim foi necessário testar o kit Qiagen. No passo **(1)** do protocolo do Kit Qiagen, foi adicionado 10  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol com o Buffer RLT. Foi tomado o cuidado de anotar a data de quando a mistura foi feita, visto que se mantém estável em temperatura ambiente por, no máximo, um mês. No passo **(3)** foi utilizado 450  $\mu$ L do Buffer RLT e o tempo de mistura no vortex é estabelecido em 2 minutos, assim tendo o tempo ideal para a o buffer surgir efeito e sem danificar o material genético. Também foi inserido um novo passo de centrifugação, com um tempo de 3 minutos e 45 segundos em velocidade máxima.

Após o passo **(4)**, o ideal é transferir o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 ml. Este passo tem como objetivo evitar contaminações adicionais na amostra. No passo **(4)** o tempo de centrifugação foi aumentado para 45 segundos á 1000 rpm. No passo **(7)** a quantidade inserida do tampão RW1 é diminuída para 500  $\mu$ L ou 550  $\mu$ L pois, com maiores quantidades, o tubo estava transbordando, afetando imediatamente nos resultados da extração. Após a centrifugação o filtro é transferido, com cuidado, para um tubo limpo. O tempo de lavagem com o tampão RPE, no passo **(8)** e **(9)**, foram alteradas para 45 segundos e 2 minutos e 45 segundos a 10.000 rpm, respectivamente. A alteração é feita para que a centrifuga tenha o tempo necessário para atingir a velocidade desejada.

### 4.4 Melhorias do Protocolo adaptado de Wani et al. 2022

A espécie *S. terebinthifolius* apresentou baixas quantidades de RNA e pureza ruim (tabela suplementar 1), assim foi necessário testar o Protocolo adaptado de Wani et al. 2022.

O PVP, utilizado no passo **(4)**, é muito usado em protocolos por auxiliar na remoção dos compostos fenólicos das plantas (KANSAL et al., 2008) e, como melhoria, foi misturado com o Buffer RLT (disponível no kit Qiagen), com o intuito de evitar contaminações e melhorar a qualidade e rendimento do RNA (ROJAS, PORTAL, JIMENIZ, 2011). No passo **(9)**, optou-se por colocar a amostra para incubar no freezer - 20°C, para ter a maior probabilidade de conservação do material genético da amostra (DUSZYN et al. 2020), assim como no passo **(15)**. No passo **(10)**, a

amostra foi agitada no vortex e misturado por pipetagem para a ativação da Free Water.

Ademais, após a adição de 0,5 µL de DNase I **(11)**, foi adicionado 400 µL de RNA Prep Buffer), seguido de centrifugação por 30 segundos e descarte. Posteriormente, 700 µL de RNA Wash Buffer foi adicionado e centrifugado, seguido do descarte do sobrenadante. Foram postos 400 µL de RNA Wash Buffer e a amostra foi centrifugada por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado novamente.

Após o passo **(17)**, foi realizado o teste de deixar as amostras *overnight* (em que se espera uma noite para realizar as lavagens com álcool), contudo, os resultados do nanodrop indicaram baixa qualidade e quantidade, com uma média de 1.4 e 1.37, respectivamente.

#### **4.5 Melhorias do Protocolo adaptado de Wacker e Godard 2005**

**(3)** Foram adicionados 100 µL de PVP. Após o passo **(2)**, é possível realizar o restante da extração em temperatura ambiente com a adição do Trizol, já que o componente auxilia na manutenção da integridade do RNA solubilizando ou precipitando outros componentes celulares (KUMAR et al., 2014). No passo **(16)** e **(17)**, no qual são realizadas as lavagens com álcool 70% e 100%, respectivamente, o vortex é utilizado para homogeneizar as amostras.

Com o objetivo de aumentar a pureza das amostras, foram realizados testes nos quais as lavagens com álcool foram efetuadas diretamente na coluna RNeasy Mini (Qiagen). Apesar do aumento da pureza, a concentração de RNA diminuiu consideravelmente (Tabela suplementar 1).

#### **4.6 Análise de Integridade e Pureza**

Ao realizar a extração com os quatro protocolos de extração de RNA, as melhorias do protocolo Kit Quick-RNA foram eficientes, pois rederam bons índices de concentração e pureza de RNA (tabela suplementar 1) para as cinco espécies *A. edulis*, *P. glabrata*, *C. vernalis*, *G. kunthiana* e *L. hasslerianum*. Nas cinco espécies vegetais os valores de RIN foram acima de 4.7 (figura 7) sendo valores compatíveis com os valores de integridade de RNA previsto para plantas que apresentam muitos compostos secundários que podem degradar facilmente RNA em plantas (GALLEGO et al. 2014). As extrações de RNA das cinco espécies atingiram o esperado (Thermo



Fisher Scientific, 2025) também para proporção recomendada das bandas dos RNAs ribossômicos (rRNA) 28S (~3500 nt) e 18S (~1800 nt), como observados nas figuras 8, 9, 10, 11 e 12.

A espécie *A. edulis* apresentou mínimo de 5,9 ng/  $\mu$ L e máximo de 189,0 ng/  $\mu$ L de concentração de RNA (tabela suplementar 1). A análise espectrométrica do RNA extraído apresentou um bom nível de pureza, com valores de razão 260/280, com valores próximos de 2,08 (tabela 2). Dos testes de extrações realizados foram escolhidas as amostras de cinco indivíduos de *A. edulis* que apresentaram bom rendimento e alta pureza de RNA (tabela 1 e tabela 2).

Para validar as qualidades do RNA extraído desses cinco indivíduos, foram realizadas as análises de RIN. O indivíduo 1 de *A. edulis* apresentou um rendimento de 189,2 ng/ $\mu$ L de RNA, um RIN de 5.6, bandas dos rRNAs 28S com ~3000nt e 18S com ~17000 (figura 8). O indivíduo 2 de *A. edulis* apresentou um rendimento de 195,0 ng/  $\mu$ L de RNA (tabela 1), um RIN de 6.0, bandas dos rRNAs 28S com ~3800nt e 18S com ~2100nt (figura 8). O indivíduo 3 da mesma espécie mostrou 165,4 ng/ $\mu$ L de RNA de rendimento (tabela 1), um RIN de 6.9, bandas dos rRNAs 28S com ~3100nt e 18S com ~2200nt (figura 8). Por fim, o indivíduo 4 obteve 100,8 ng/ $\mu$ L de RNA de rendimento (tabela 1), um RIN de 6.9, bandas dos rRNAs 28S com ~1200nt e 18S com ~800nt (figura 8).

A espécie *C. vernalis* apresentou mínimo de 8,8 ng/  $\mu$ L e máximo de 70,7 ng/  $\mu$ L de concentração de RNA (tabela suplementar 1). A análise espectrométrica do RNA extraído da espécie também apresentou um bom nível de pureza, com razão 260/280, próximo de 2,14. Foram escolhidas as amostras de cinco indivíduos da espécie que apresentaram rendimentos ideais e alta pureza de RNA (tabela 1 e 2).

Nas análises de RIN da espécie, o indivíduo 1 de *C. vernalis* apresentou um rendimento de 41,3 ng/ $\mu$ L de RNA (tabela 1), um RIN de 6.6, bandas dos rRNAs 28S com ~1000nt e 18S com 1050nt (figura 9). O indivíduo 2 de apresentou um rendimento de 46,3 ng/  $\mu$ L de RNA (tabela 1), um RIN de 6.2, bandas dos rRNAs 28S com ~1050nt e 18S com ~1000nt (figura 9). O indivíduo 3 da mesma espécie mostrou 70,0 ng/ $\mu$ L de RNA de rendimento (tabela 1), um RIN de 6.3, bandas dos rRNAs 28S com ~1050nt e 18S com ~800nt (figura 9). O indivíduo 4 obteve 24,4 ng/ $\mu$ L de RNA de rendimento (tabela 1), um RIN de 6.4, bandas dos rRNAs 28S com ~1500nt e 18S com ~1300nt (figura 9). Por fim, o indivíduo 5 da espécie *C. vernalis* obteve 42,4 ng/ $\mu$ L de RNA de rendimento (tabela 1), um RIN de 7.2, bandas dos rRNAs 28S com ~1550nt e 18S

com ~1300nt (figura 9). Foram escolhidas as amostras de cinco indivíduos da espécie *C. vernalis* que apresentaram rendimentos ideais e alta pureza de RNA (tabela 1 e tabela 2).

A espécie *G. kunthiana* apresentou mínimo de 24,7 ng/  $\mu$ L e máximo de 72,6 ng/  $\mu$ L de concentração de RNA (tabela suplementar 1). A análise espectrométrica do RNA extraído da espécie também apresentou um bom nível de pureza, com razão 260/280, próximo de 2,04. Foram escolhidas as amostras de cinco indivíduos da espécie que apresentaram rendimentos ideais e alta pureza de RNA (tabela 1 e tabela 2).

Nas análises de RIN da espécie, o indivíduo 1 apresentou um rendimento de 55,2 ng/ $\mu$ L de RNA (tabela 1), um RIN de 6.7, bandas dos rRNAs 28S com ~1900nt e 18S com ~1500nt (figura 10). O indivíduo 2 de *G. kunthiana* apresentou um rendimento de 27,3 ng/  $\mu$ L de RNA (tabela 1), um RIN de 4.7, bandas dos rRNAs 28S com ~300nt e 18S com ~300nt (figura 10). O indivíduo 3 mostrou 30,3 ng/ $\mu$ L de RNA de rendimento (tabela 1), um RIN de 6.4, bandas dos rRNAs 28S com ~500nt e 18S com ~350nt (figura 10). O indivíduo 4 da mesma espécie obteve 109,7 ng/ $\mu$ L de RNA de rendimento (tabela 1), um RIN de 5.7, bandas dos rRNAs 28S com ~1200nt e 18S com ~900nt (figura 10). Por fim, o indivíduo 5 da espécie obteve 53,8 ng/ $\mu$ L de RNA de rendimento (tabela 1), um RIN de 7.1, bandas dos rRNAs 28S com ~2100nt e 18S com ~750nt (figura 10). Foram escolhidas as amostras de cinco indivíduos da espécie *G. kunthiana* que apresentaram rendimentos ideais e alta pureza de RNA (tabela 1 e tabela 2).

A espécie *L. hasslerianum*, apresentou mínimo de 19,1 ng/  $\mu$ L e máximo de 93,5 ng/  $\mu$ L de concentração de RNA (tabela suplementar 1). A análise espectrométrica do RNA extraído da espécie *L. hasslerianum* também apresentou um bom nível de pureza, com razão 260/280, razão próxima de 2,2. Também foram escolhidas as amostras de cinco indivíduos da espécie que apresentaram rendimentos ideais e alta pureza de RNA (tabela 1 e tabela 2).

Nas análises de RIN da espécie, o indivíduo 1 apresentou um rendimento de 55,2 ng/ $\mu$ L de RNA (tabela 1), um RIN de 4.7, bandas dos rRNAs 28S com ~1100nt e 18S com ~1050nt (figura 11). O indivíduo 2 apresentou um rendimento de 27,3 ng/  $\mu$ L de RNA (tabela 1), um RIN de 5.8, bandas dos rRNAs 28S com ~100nt e 18S com ~950nt (figura 11). O indivíduo 3 de *L. hasslerianum* mostrou 61,2 ng/ $\mu$ L de RNA de rendimento (tabela 1), um RIN de 7.3, bandas dos rRNAs 28S com ~2800nt e 18S

com ~2150nt (figura 11). O indivíduo 4 da mesma espécie obteve 109,7 ng/μL de RNA de rendimento (tabela 1), um RIN de 6.7, bandas dos rRNAs 28S com ~2700nt e 18S com ~1000nt (figura 11). Por fim, o indivíduo 5 da espécie obteve 53,8 ng/μL de RNA de rendimento (tabela 1), um RIN de 6.3, bandas dos rRNAs 28S com ~1800nt e 18S com ~1300nt (figura 11). Foram escolhidas as amostras de cinco indivíduos da espécie que apresentaram rendimentos ideais e alta pureza de RNA (tabela 1 e tabela 2).

A espécie *P. glabrata* apresentou mínimo de 7,6 ng/ μL e máximo de 255,7 ng/ μL de concentração de RNA (tabela suplementar 1). A análise espectrométrica do RNA extraído da espécie também apresentou um bom nível de pureza, com razão 260/280, próximos de 2,03. Foram escolhidas as amostras de cinco indivíduos de *P. glabrata* que apresentaram rendimentos ideais e alta pureza de RNA (tabela 1 e 2).

Para validar as qualidades do RNA extraído desses cinco indivíduos, foram realizadas as análises de RIN. O indivíduo 1 de *P. glabrata* apresentou um rendimento de 151,8 ng/μL de RNA (tabela 1), um RIN de 5.6, bandas dos rRNAs 28S com ~12.4nt e 18S com ~8.1nt (figura 12) indivíduo 2 de apresentou um rendimento de 255,7 ng/ μL de RNA (tabela 1), um RIN de 5.9, bandas dos rRNAs 28S com ~12nt e 18S com ~8.7nt (figura 12). O indivíduo 3 da mesma espécie mostrou 80,8 ng/μL de RNA de rendimento (tabela 1), um RIN de 6.5, bandas dos rRNAs 28S com ~4.6nt e 18S com ~4.4nt (figura 12). O indivíduo 4 obteve 161,2 ng/μL de RNA de rendimento (tabela 1), um RIN de 7.7, bandas dos rRNAs 28S com ~10.5nt e 18S com ~8.1nt (figura 12). Por fim, o indivíduo 5 da espécie obteve 230,7 ng/μL de RNA de rendimento (tabela 1), um RIN de 6.5, bandas dos rRNAs 28S com ~14.5nt e 18S com ~10.3nt (figura 12). Foram igualmente escolhidas as amostras de cinco indivíduos da espécie que apresentaram rendimentos ideais e alta pureza de RNA (tabela 1 e tabela 2).

Tabela 1: Quantidade de ng/μL de RNA nos indivíduos de cada espécie

| Espécie                | Ind. 1<br>(ng/μL) | Ind. 2<br>(ng/μL) | Ind. 3<br>(ng/μL) | Ind. 4<br>(ng/μL) | Ind. 5<br>(ng/μL) |
|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <i>A. edulis</i>       | 189,2 ng/μL       | 195,0 ng/μL       | 165,4 ng/μL       | 100,8 ng/μL       | -                 |
| <i>C. vernalis</i>     | 41,3 ng/μL        | 46,3 ng/μL        | 70,0 ng/μL        | 24,4 ng/μL        | 42,4 ng/μL        |
| <i>G. kunthiana</i>    | 55,2 ng/μL        | 27,3 ng/μL        | 30,3 ng/μL        | 109,7 ng/μL       | 53,8 ng/μL        |
| <i>L. hasslerianum</i> | 55,2 ng/μL        | 27,3 ng/μL        | 30,3 ng/μL        | 109,7 ng/μL       | 53,8 ng/μL        |
| <i>P. glabrata</i>     | 151,8 ng/μL       | 255,7 ng/μL       | 80,8 ng/μL        | 161,2 ng/μL       | 230,7 ng/μL       |

Fonte: Dados da pesquisa

Tabela 2: Relações entre as absorbâncias 260/280 dos indivíduos de cada espécie

| Espécie                | Ind. 1<br>260/280 | Ind. 2<br>260/280 | Ind. 3<br>260/280 | Ind. 4<br>260/280 | Ind. 5<br>260/280 |
|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <i>A. edulis</i>       | 5.9               | 6.0               | 6.9               | 6.9               | -                 |
| <i>C. vernalis</i>     | 6.6               | 6.2               | 6.3               | 6.4               | 7.2               |
| <i>G. kunthiana</i>    | 6.7               | 4.7               | 6.4               | 5.7               | 7.1               |
| <i>L. hasslerianum</i> | 4.7               | 5.8               | 7.3               | 6.7               | 6.3               |
| <i>P. glabrata</i>     | 5.6               | 5.9               | 6.5               | 7.7               | 6.5               |

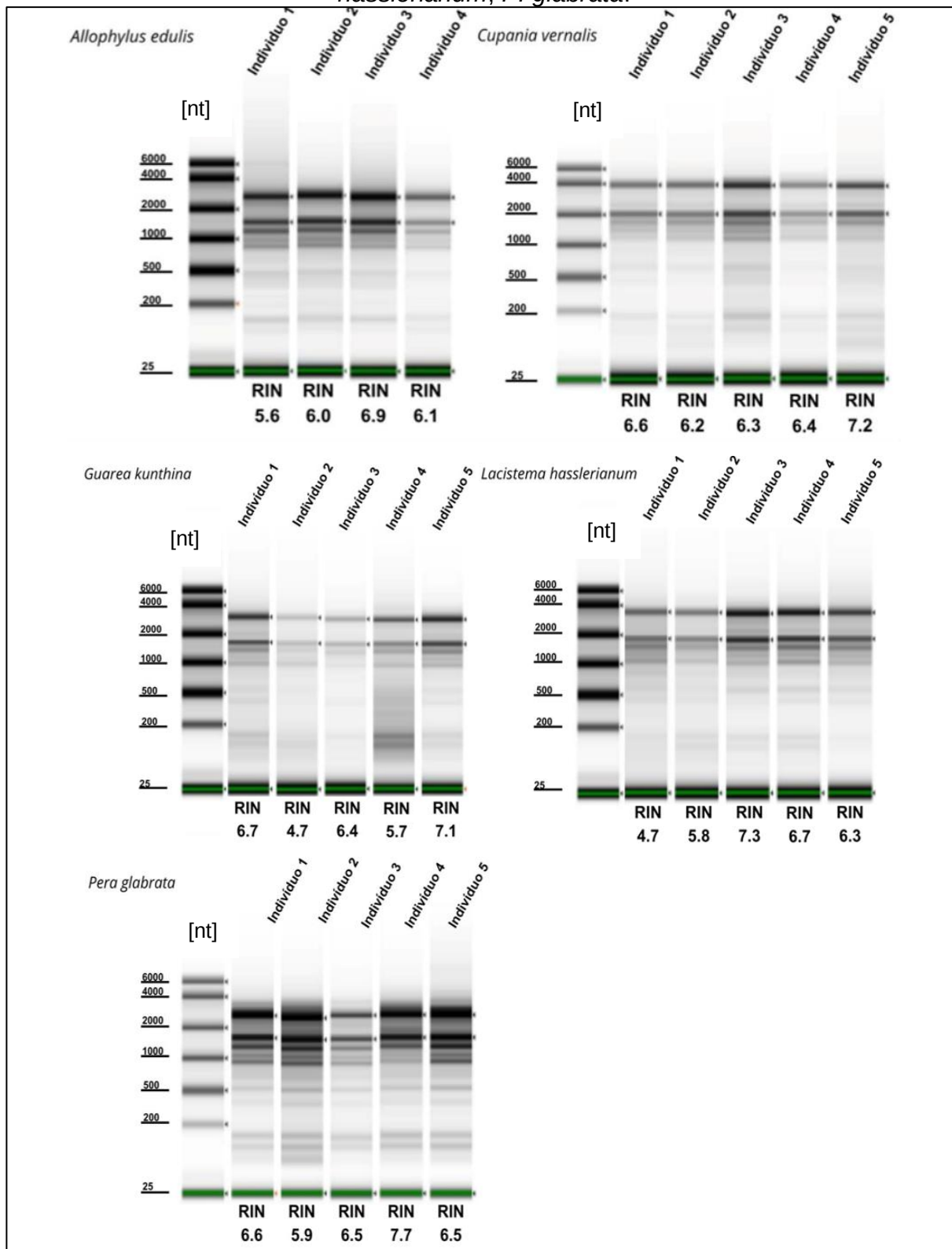
Fonte: Dados da pesquisa

A espécie *S. terebinthifolius* apresentou RNA de concentração insatisfatória e pureza baixa com o protocolo Kit Quick-RNA (tabela suplementar 1). Também foram testados o Kit comercial Qiagen, Protocolo adaptado de Wani et al. 2022 e o protocolo adaptado de Wacker e Godard (2005) (tabela suplementar 1), totalizando 71 tentativas de extrações de RNA. Contudo, ainda assim não foram obtidas grandes melhorias.

Observamos nos resultados que o protocolo adaptado de Wacker e Godard (2005) obteve os melhores resultados na concentração de RNA, com um mínimo de 0.8 ng/μL e um máximo de 1069.1 ng/μL (tabela complementar 1). Já para a pureza de RNA da espécie *S. terebinthifolius*, o protocolo que apresentou os melhores resultado foi o adaptado de Wani et al. 2022, com mínimo de 0.87 e um máximo de 2.58 (tabela complementar 1)

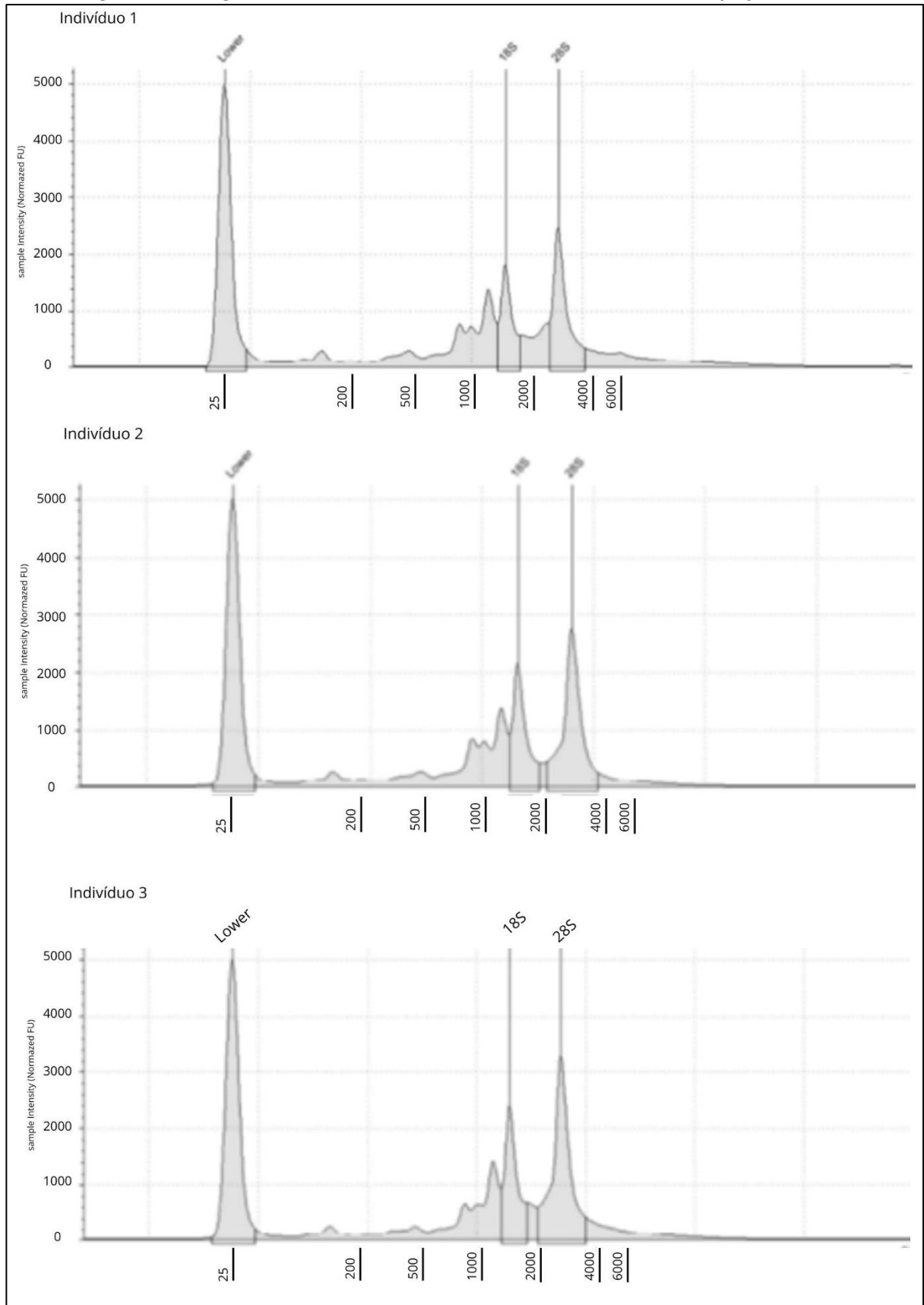
Pela falta de sucesso das extrações na espécie, tanto em concentração como pureza, a mesma não foi enviada para a construção de transcriptoma. A dificuldade de obter resultados satisfatório com a *S. terebinthifolius* se dá, principalmente, pela a espécie expressar um alto teor de compostos secundários (OLIVEIRA et al. 2024) o que dificulta boas extrações de RNA (GASIC et al., 2004).

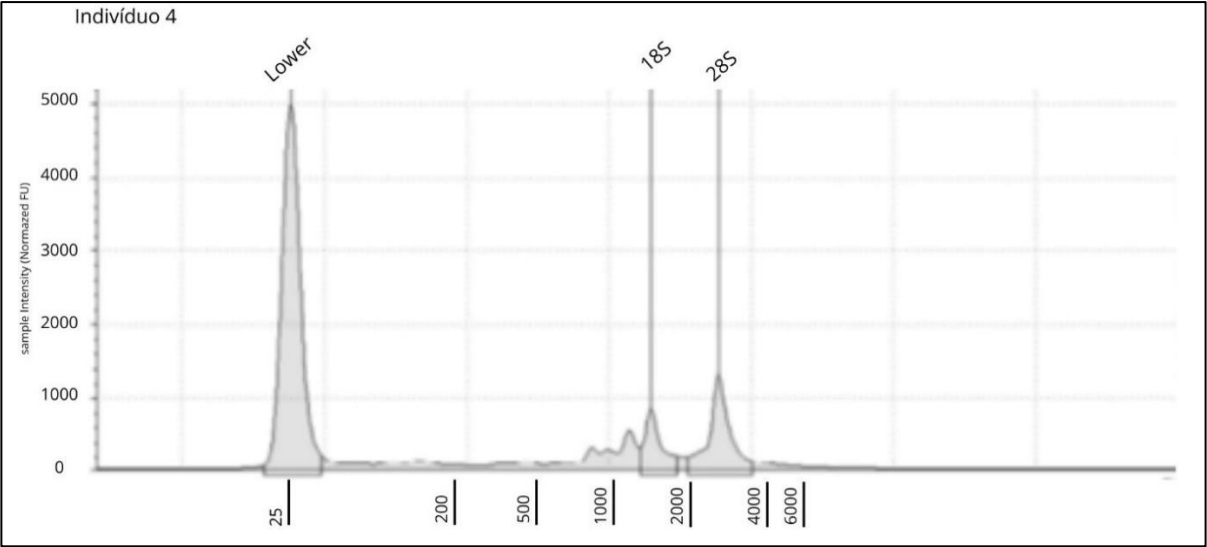
Figura 7: Análise de gel de eletroforese de *A. edulis*, *C. vernalis*, *G. kunthiana*, *L. hasslerianum*, *P. glabrata*.



Fonte: Dados da pesquisa.

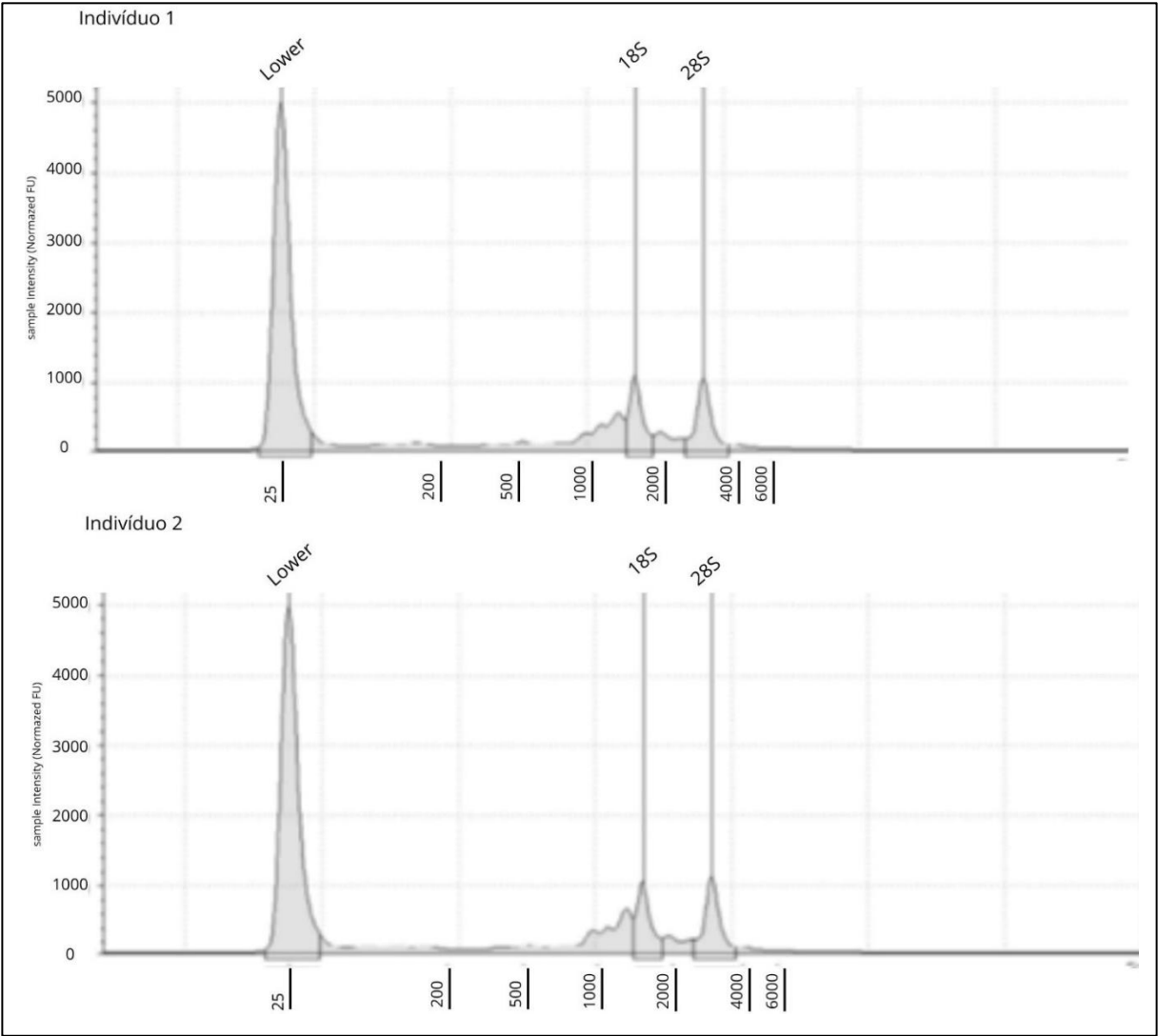
Figura 8: Integridade do RNA isolado dos indivíduos de *Allophylus edulis*

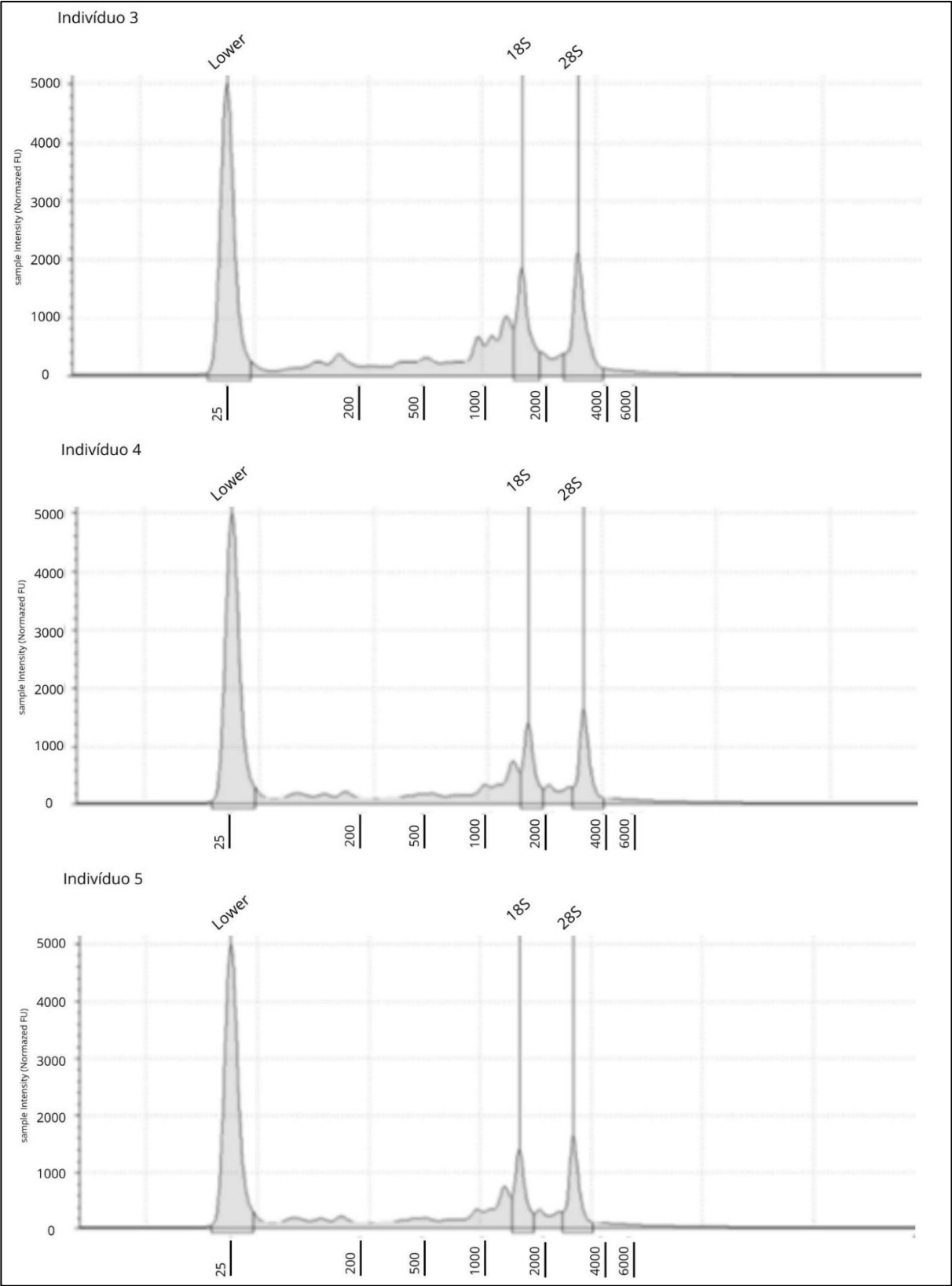




Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 9: Integridade do RNA isolado dos indivíduos de *Cupania vernalis*

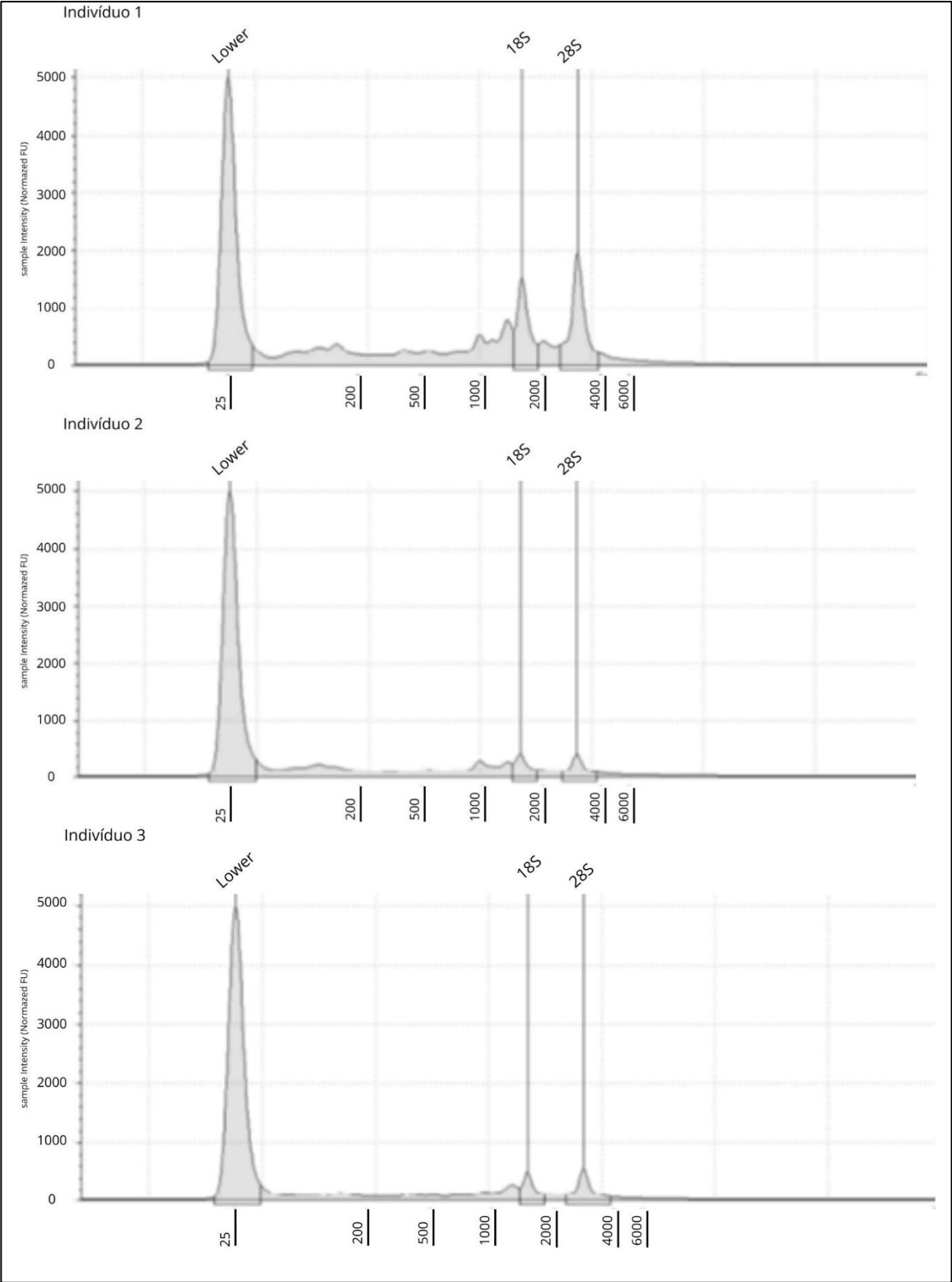


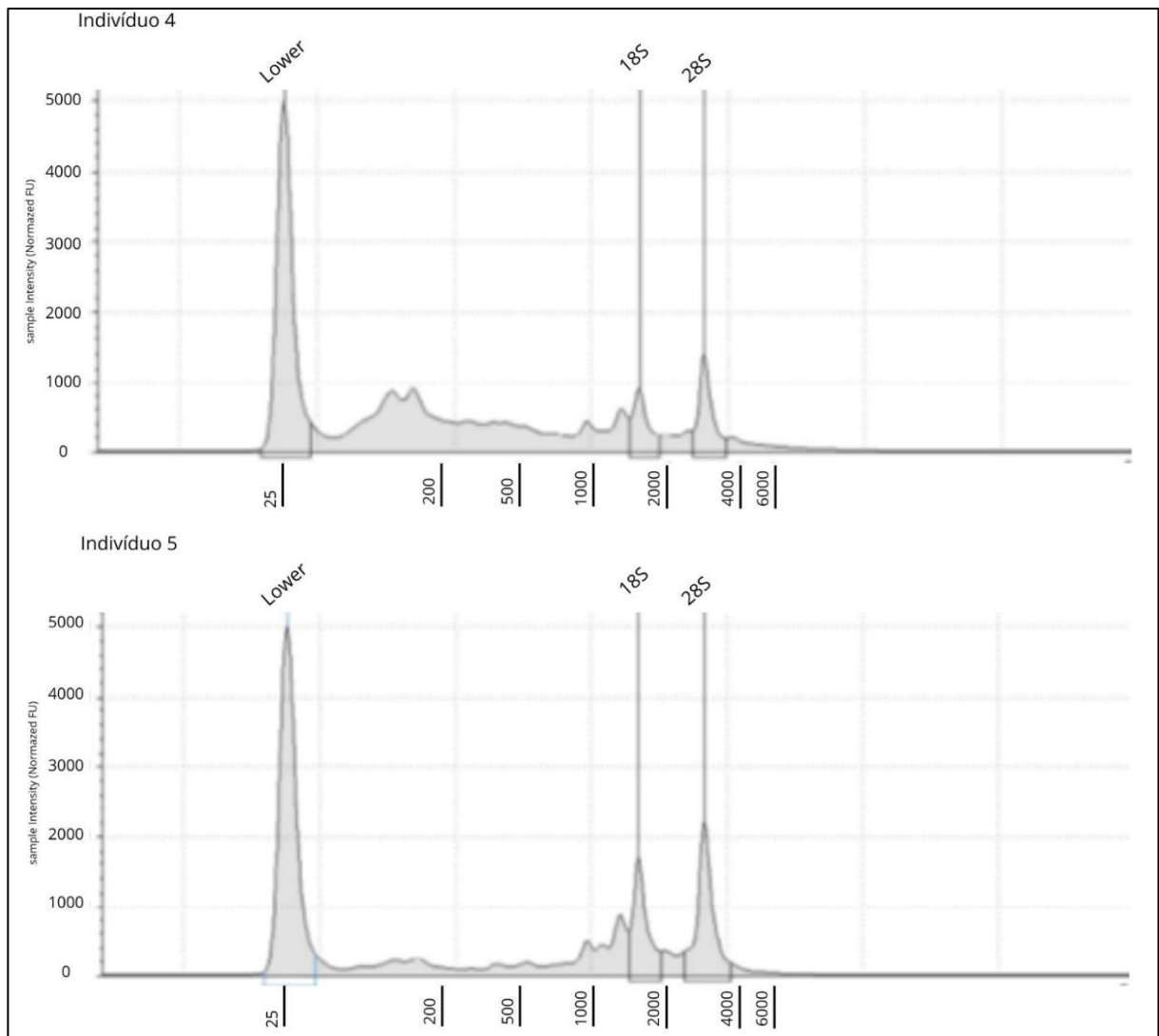


Fonte: Dados da pesquisa



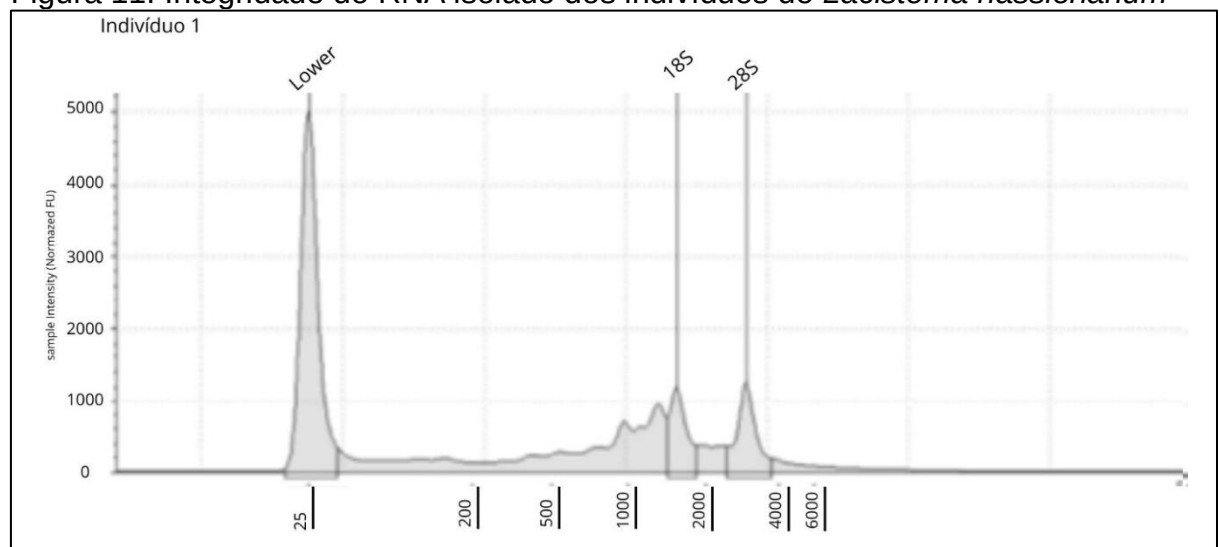
Figura 10: Integridade do RNA isolado dos indivíduos de *Guarea kunthiana*

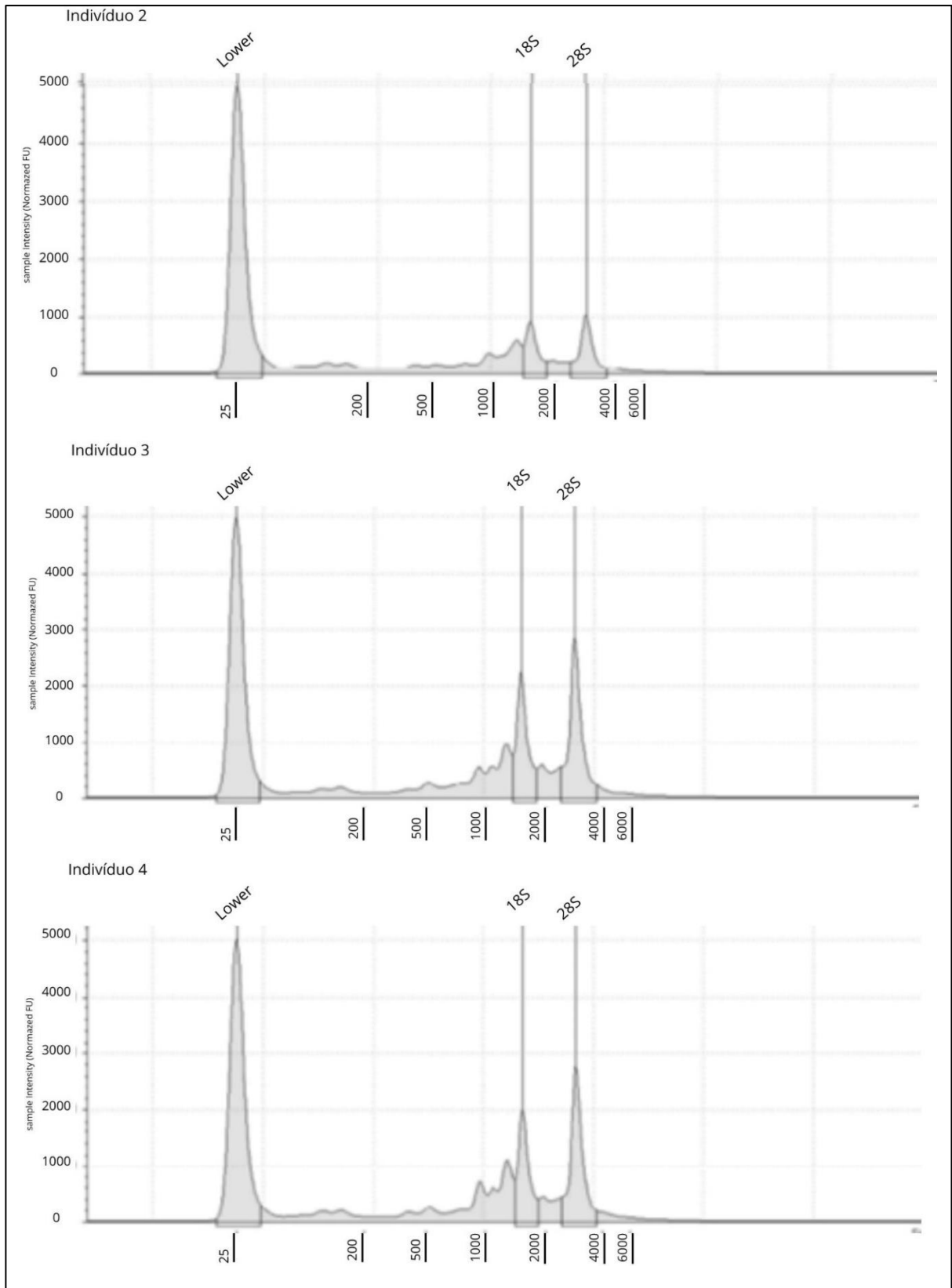


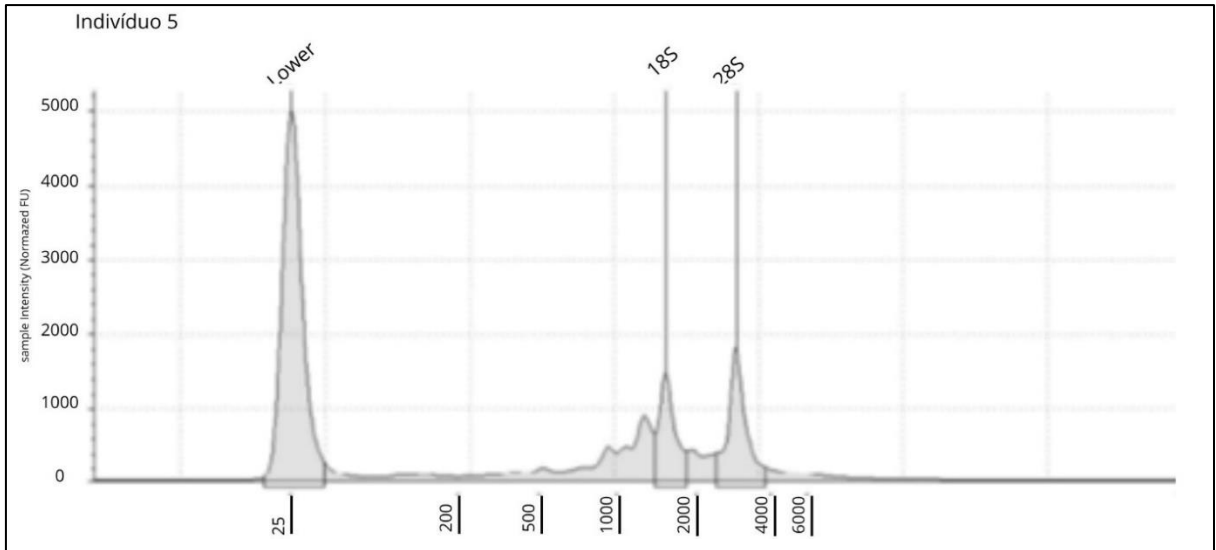


Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 11: Integridade do RNA isolado dos indivíduos de *Lacistema hasslerianum*

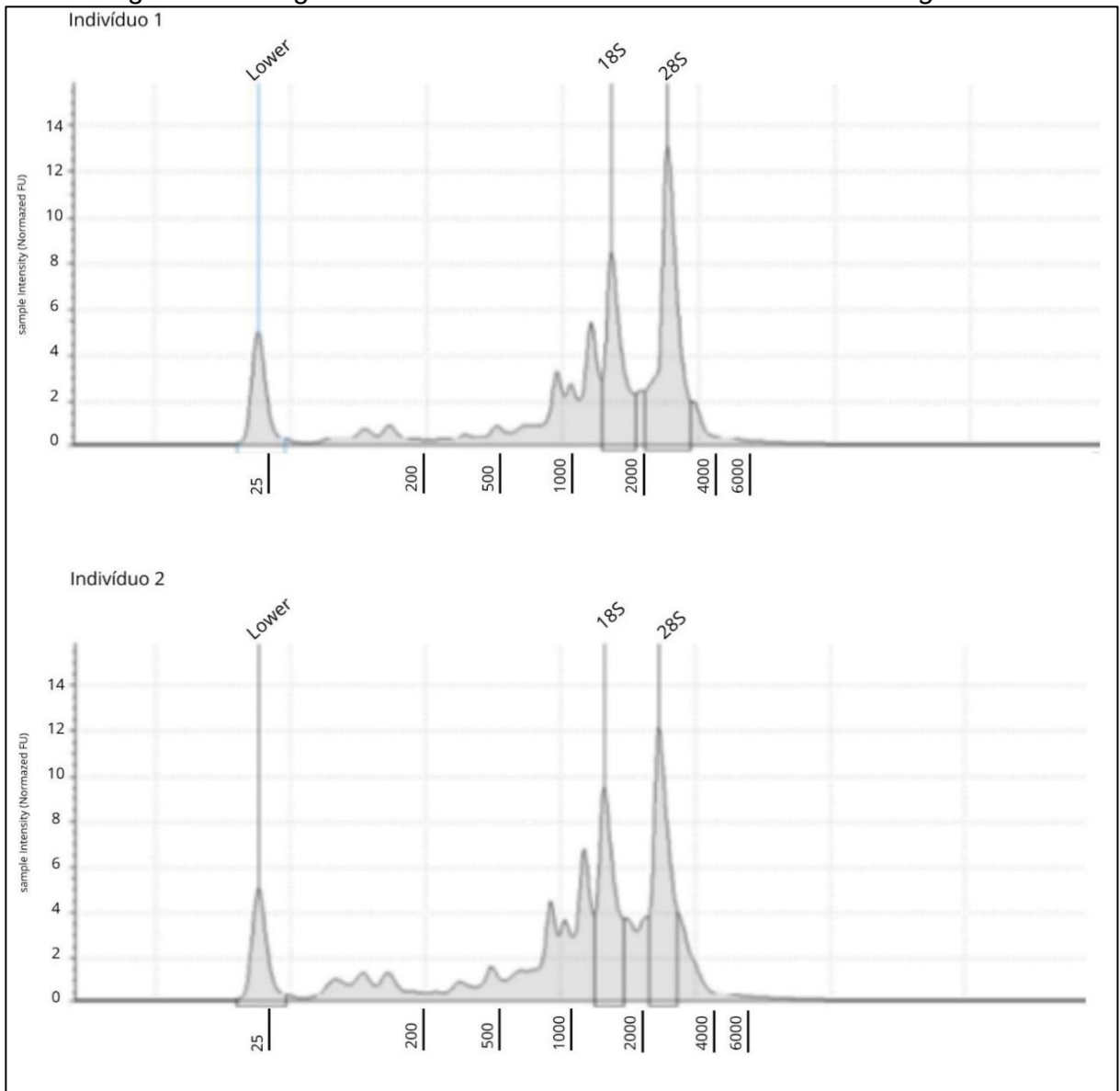


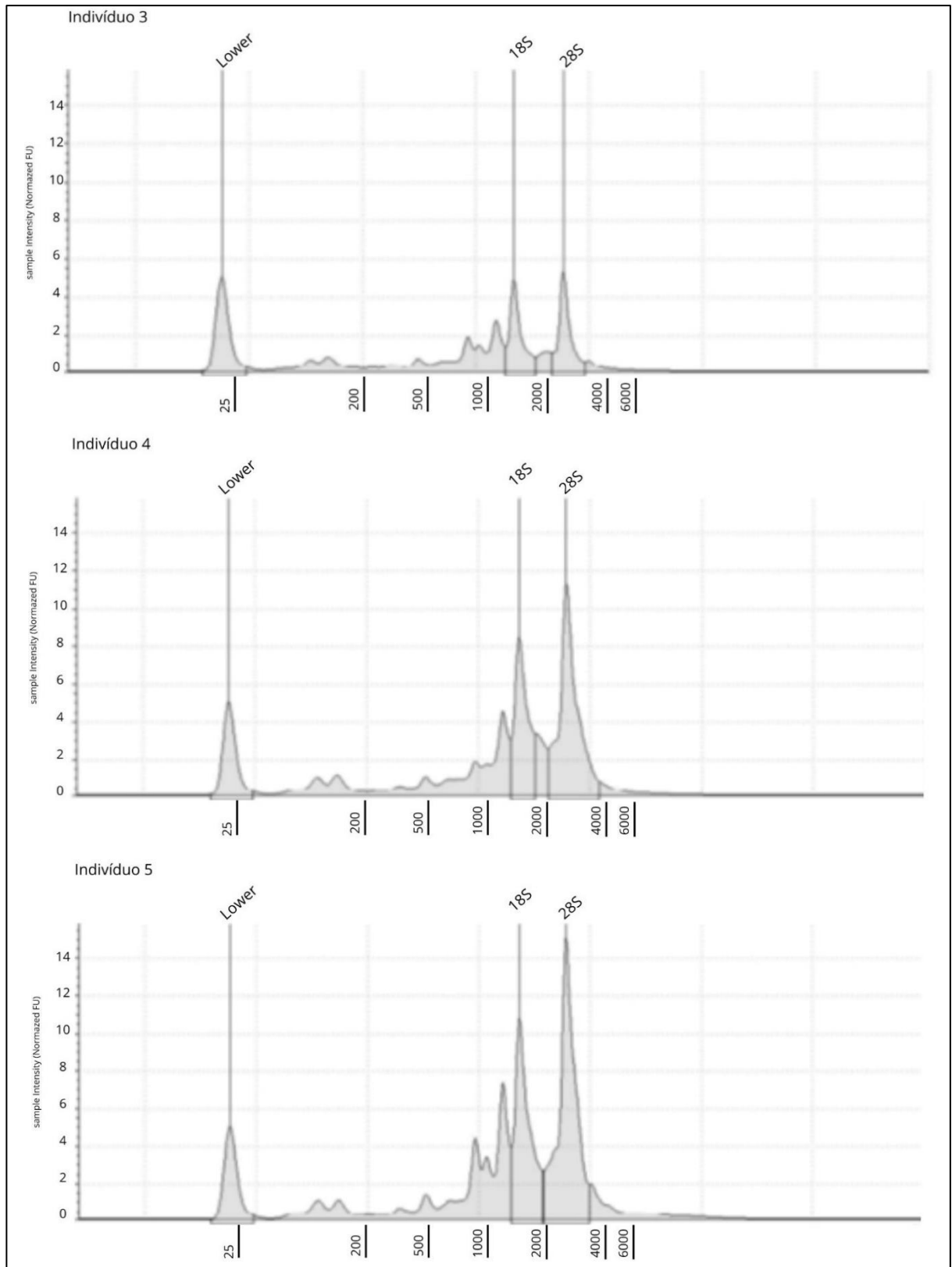




Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 12: Integridade do RNA isolado dos indivíduos de *Pera glabrata*





Fonte: Dados da pesquisa.

#### 4.7 Montagem *de novo* e qualidade dos transcriptomas

Os sequenciamentos *de novo* foram realizados para as cinco espécies: *A. edulis*, *C. vernalis*, *G. kunthiana*, *L. hasslerianum* e *P. glabrata*, pois não existem genomas de referência. Para obter maior qualidade dos transcriptomas as sequências foram filtradas para a remoção de adaptadores e materiais contaminados. Em seguida, o controle de qualidade dos dados de RNA-seq foi examinado por FastQC

Até o momento, não há genomas ou transcriptomas montados para as cinco espécies analisadas, o que torna os resultados deste estudo inéditos.

As amostras apresentaram sequências de alta qualidade, aproximadamente entre 13 a 24 milhões de leituras para as cinco espécies vegetais (tabelas 3, 4, 5, 6 e 7). Os conteúdos de GC estão entre 43% a 55%, são esses os valores estimados para plantas (tabelas 3, 4, 5, 6 e 7). Todos os transcriptomas apresentaram profundidade de cobertura, com as bases lidas (A, T, C, G) das reads de RNA-seq entre 1.9Gbp a 3.5Gbp (tabelas 3, 4, 5, 6 e 7).

Conforme mostrado na tabela 3, o indivíduo 4 da espécie *Allophylus edulis* obteve o maior número de total de sequência, com um total de 17.101.309. Além disso, apresentou um total de base 2.3 (Gbp) e %GC de 54, respectivamente.

Para a espécie *Cupania vernalis* ( tabela 4) o indivíduo 5 resultou os maiores número de total de sequência com 16.119.770 e total de base, de 2.2. Contudo, o indivíduo 4 mostrou um maior resultado em %GC, com 54.

A espécie *Guarea kunthiana*, demonstrada na tabela 5, mostrou o indivíduo 1 com 16.636.947 de total de sequência e 2.3 de total de base, sendo os maiores números da espécie. Já em %GC, o indivíduo 4 teve o melhor resultado, com 54.

Demonstrada na tabela 6, a espécie *Lacistema hasslerianum* obteve os maiores valores para o indivíduo 3 com 18.203.043 de total de sequência. Os indivíduos 1 e 3 igualmente com 2.4 em total de base, observado maior valor de total de base. Por fim, indivíduo 3 com maior valor de 54% do conteúdo GC .

Por último, a espécie *Pera Glabrata* (tabela 7), mostrou o indivíduo 2 com maior número de do total de sequência, de 24.042.714; e maior valor, no indivíduo 4, com 3.5 em total de base. Para %GC, ambos indivíduos 4 e 5 resultaram em 51.

Tabela 3: Fastqc da espécie *Allophylus edulis*

| <i>Allophylus edulis</i> | Indivíduo 1 | Indivíduo 2 | Indivíduo 3 | Indivíduo 4 |
|--------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Total de sequência       | 17.871.664  | 15.254.631  | 15.662.998  | 17.101.398  |
| Total de base (Gbp)      | 2           | 2           | 2.2         | 2.3         |
| %GC                      | 53          | 52          | 52          | 54          |

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 4: Fastqc da espécie *Cupania vernalis*

| <i>Cupania vernalis</i> | Indivíduo 1 | Indivíduo 2 | Indivíduo 3 | Indivíduo 4 | Indivíduo 5 |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Total de sequência      | 15.462.290  | 15.879.713  | 15.980.368  | 15.003.282  | 16.119.770  |
| Total de base (Gbp)     | 2           | 2.1         | 2.2         | 2           | 2.2         |
| %GC                     | 44          | 48          | 52          | 54          | 51          |

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 5: Fastqc da espécie *Guarea kunthiana*

| <i>Guarea kunthiana</i> | Indivíduo 1 | Indivíduo 2 | Indivíduo 3 | Indivíduo 4 | Indivíduo 5 |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Total de sequência      | 16.636.947  | 16.194.055  | 13.702.160  | 14.988.622  | 15.748.210  |
| Total de base (Gbp)     | 2.3         | 2.2         | 1.8         | 2.1         | 2.2         |
| %GC                     | 53          | 54          | 53          | 55          | 52          |

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 6: Fastqc da espécie *Lacistema hasslerianum*

| <i>Lacistema hasslerianum</i> | Indivíduo 1 | Indivíduo 2 | Indivíduo 3 | Indivíduo 4 | Indivíduo 5 |
|-------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Total de sequência            | 17.625.612  | 14.780.219  | 18.203.043  | 15.924.839  | 14.687.992  |
| Total de base (Gbp)           | 2.4         | 2           | 2.4         | 2.2         | 1.9         |
| %GC                           | 50          | 53          | 45          | 51          | 43          |

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 7: Fastqc da espécie *Pera glabrata*

| <i>Pera glabrata</i> | Indivíduo 1 | Indivíduo 2 | Indivíduo 3 | Indivíduo 4 | Indivíduo 5 |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Total de sequência   | 17.085.177  | 24.042.714  | 17.313.719  | 14.138.624  | 16.934.503  |
| Total de base (Gbp)  | 2.5         | 3.4         | 2.5         | 3.5         | 2.5         |
| %GC                  | 47          | 44          | 43          | 51          | 51          |

Fonte: Dados da pesquisa.



## 5 CONCLUSÃO

A maioria dos kits comerciais que foram utilizados para a extração de RNA não apresentam detalhes em seus processos e passos, o que dificulta o processo de extração. Além disso, muitas espécies nativas precisam de mudanças específicas no protocolo devido suas características metabólicas. Os transcriptomas gerados a partir das melhorias de protocolos desse estudo apresentaram qualidade satisfatória para as espécies *P. glabrata*, *G. kunthiana*, *C. Vernalis*, *L. hasslerianum*, *A. edulis*.

A espécie *S. terebinthifolia* não apresentou resultados significantes de pureza e rendimento de RNA, não tornando possível a construção de seu transcriptoma. Para a espécie, são necessário estudos mais aprofundados para entender suas especificações metabólicas e, por fim, extrair RNA com pureza e rendimento ideais para a construção de transcriptoma.

## 6 REFERÊNCIAS

- Asquith N. M; Terborgh J; Arnold A. E; Riveros C. M. The fruits the agouti ate: *Hymenaea courbaril* seed fate when its disperser is absent, *J. Trop. Ecol.* 15:229–235.
- Bastos, R. B.; Desidério, J. A.; Lemos, M. V. F.; Augusto, M. L. 2016. *Tópicos Especiais em Genética Aplicada*. 3 ed. Jaboticabal-SP: Funep, 1 p.
- Becskei, A., & Rahaman, S. (2022). The life and death of RNA across temperatures. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 4325-4336.
- Benicio, C. C. S.; 2015. *Análise do transcriptoma e de sequências genômicas de variedades comerciais de cana de açúcar*. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas. 104 p.
- Berg, E. V. D.; Oliveira-Filho, A. T. 2000. Composição florística e estrutura fitossociológica de uma floresta ripária em Itutinga, MG, e comparação com outras áreas. *Revista Brasileira de Botânica*, v.23, n.3, p.231-253.
- Chang, S; Puryear, J; Cairney, J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, Athens, v. 11, n. 2, p.113-116.
- Cheliak, W. M.; Pitel, J. A. 1984. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. *Information report PI-X*, Ontario, v.42, p.1-13.
- Cristina, M. Fragoso, R; Santos, M; Gomes, L. 2010. *Protocolo para extração de RNA de plantas nativas do Bioma Cerrado e Amazônico*. Brasília, 170.
- Defilippi, B.G; Manriquez, D.; Luengwilai, K.; Gonzalez-Aguero, M. 2009. Voláteis do aroma: Biossíntese e mecanismos de modulação durante o amadurecimento dos frutos. *Adv. Bot. O RES.* 50,1–37.

DeLuca DS, Levin JZ, Sivachenko A, Fennell T, Nazaire MD, Williams C, Reich M, Winckler W, Getz G. 2012. RNA-SeQC: RNA-seq metrics for quality control and process optimization. *Bioinformatics*. Jun 1;28(11):1530-2.

Ding LW, Sun QY, Wang ZY, Sun YB, Xu Z. 2001. Using silica particles to isolate total RNA from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine thiocyanate. *Anal Biochem*. 374:426-428.

Duszyn, M., Świeżawska-Boniecka, B., Kwiatkowski, M., Jaworski, K., & Szmidt-Jaworska, A. 2020. Optimization of Extraction and Purification of RNA from Plant Bulbs. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 62(2), 17–30.

Garcia, E. S. 1995. Biodiversity, Biotechnology and Health. *Cad. Saúde Públ.*, Rio de Janeiro, 11 (3): 495-500, Jul/Sep.

Gasik, K. et al. 2004. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Mol. Biol. Rep.* 22: 437-438.

Gesteira, A, et al. 2003. Isolation and purification of functional total RNA from different organs of cacao tree during its interaction with the pathogen *Crinipellis pernicios*. *Biotechniques* 35: 494-496.

Gallego Romero, I., Pai, A.A., Tung, J. et al. 2014. RNA-seq: impact of RNA degradation on transcript quantification. *BMC Biol* 12, 42.

Ghawana, S.; Paul, A.; Kumar, H.; Kumar, A.; Singh, H.; Bhardwaj, PK; Rani, A.; Singh, RS; Raizada, J.; Singh, K.; et al. 2011. Um sistema de isolamento de RNA para tecidos vegetais ricos em metabólitos secundários. *BMC Resm* 4, 85.

Gomes, B. Z.; Martins, F. R.; Tamashiro, J. Y. Estrutura do cerradão e da transição entre cerradão e floresta paludícola num fragmento da International Paper do Brasil Ltda., em Brotas, SP. *Revista Brasileira de Botânica*, v.27, n.2.

Kansal R, Kuhar K, Verma I, Gupta R, Gupta V, Koundal K. 2008. Improved and convenient method of RNA isolation from polyphenols and polysaccharide rich plant tissues. *Indian J Exp Biol*.

Lal, L.; Sahoo. R.; Gupta, RK.; Sharma, P.; Kumar, S. 2008. RNA isolation from high-phenolic tea leaves and apical buds. *Plant Mol Biol Rep*, 19:181a-181f.

Lefort, F. Douglas, G. 1999 An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species. *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. *Ann. For. Sci.* 56 259.

Lehmann, U; Kreipe, H. 2001. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffinembedded biopsies. *Methods*, v. 25, p. 409-18.

Mitra, D; Kootstra, A. 1993. Isolation of RNA from apple skin. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11: 326-332.

Morante, J. C.; Sellés, S. M.; Martínez, A. M; Martínez, M. M.; Luque, I. R. 2014. RNA isolation from loquat and other recalcitrant woody plants with high quality and yield, *Analytical Biochemistry*, Vol. 452, p.46-53.

Morazona, O.; Marra, M. A. 2008. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics* 92:255-264.

Oliveira, K. C. et al. 2024. Essential oil from the leaves, fruits and twigs of *Schinus terebinthifolius*: chemical composition, antioxidant and antibacterial potential. *Molecules*, Basel, v. 29, n. 2, p. 469.

Pereira-Silva, E. F. L. et al. 2004. Florística e fitossociologia dos estratos arbustivo e arbóreo de um remanescente de cerradão em uma unidade de conservação do Estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Botânica*, v.27, n.3, p.533-544.

Pereira, O. J.; Goms, J. M. L. Levantamento florístico das comunidades vegetais de restinga no município de Conceição da Barra-ES. In: Simpósio de Ecossistemas da Costa Brasileira, ACIESP, 3., São Paulo, 1994. Anais. São Paulo, 1994. p.67-78.

Pinto, L. V. A. et al. 2005. Distribuição das espécies arbóreas-arbustivas ao longo do gradiente de umidade do solo de nascentes pontuais da bacia hidrográfica do Ribeirão Santa Cruz, Lavras, MG. *Cerne*, v.11, n.3, p.294-305.

Pizo, M. A.; Galetti, M. 2010. Métodos e perspectivas do estudo da frugivoria e dispersão de sementes por aves. *Ornitologia e conservação: ciência aplicada, técnicas de pesquisa e levantamento*, Technical Books, p.492-504.

Prasanna, V.; Prabha, T.N.; Tharanathan, R.N. 2007. Fenômenos de amadurecimento dos frutos: Uma visão geral. *Crítica. Rev. Food Sci. Nutr.* 47,1–19.

Rahmani, F. Amraee, L. 2020 Modified CTAB protocol for RNA extraction from Lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Acta Agriculturae Slovenica* 115-53.

Rojas, Luis & Portal, Orelvis & Jimenez, Elio & Correspondencia. (2011). Extracción de ARN total en plantas y hongos filamentosos. *Biotecnología Vegetal*. 11. 213-222.

Salzman, R. 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.

Silva, M. G.; Tabarelli, M. 2001. Seed dispersal, plant recruitment and spatial distribution of *Bactris acanthocarpa* Martius (Arecaceae) in a remnant of Atlantic forest in northeast Brazil. *Acta Oecologica*, 22(5-6), 259–268.

Silva, R.M.; Ribeiro, E.A.; Canto, A.L.; Moraes, L.H.F.; Canevari, R.A. 2016. Análise da expressão dos genes *serpina1* e *tff3* na predição do envolvimento de linfonodos em neoplasias mamárias. *Educação e Ciência para a Cidadania Global*. v.22, p.1-16.

Talora, D. C.; Morellato, L. P. C. 2002. Fenologia de espécies arbóreas em floresta de planícies litorâneas no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v.23, n.1, p.13-26.

Wacker MJ, Godard MP. 2005. Analysis of one-step and two-step real-time RT-PCR using SuperScript III. *J Biomol Tech*. 16(3):266-271.

Wani, U.M., Wani, Z.A., Koul, A.M. *et al.* 2022. Isolation of high-quality RNA for high throughput applications from secondary metabolite-rich *Crocus sativus* L. *BMC Res Notes* 15, 214.

Wang, L.; Feng, Z.; Wang, X. Zhang, X. 2009. DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics*. 26:136-138.

Wang, Z.; Snyder, M. 2009. RNA-Seq: Uma ferramenta revolucionária para transcriptômica. *Nat. Rev. Genet.* 10 , 57–63.

Willems, J. H.; Bik, L. P. M. 1998. Restoration of high species density in calcareous grassland: the role of seed rain and soil seed bank. *Applied Vegetation Science*, 1(1), p. 91-100.

Xiang N., Lu B., Yuan T., Yang T., Guo J., Wu Z., Liu H., Liu X. and Qin R. 2023. De novo transcriptome assembly and EST-SSR marker development and application in *Chrysosplenium macrophyllum*, *Genes*, 14, 279.

Yan, WJ; Pendi, FH; Hussain, H. 2022. Método CTAB aprimorado para extração de RNA de tecidos foliares cerosos espessos de palmeira sagu (*Metroxylon sagu* Rottb). *Química. Biologia. Tecnologia. Agric.* 9, 63.

Zeng, Y; Yang, T. 2002. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. *Plant Mol. Biol. Rep.* 20: 417.

## MATERIAL COMPLEMENTAR

Tabela suplementar 1

| <b>Espécie</b>     | <b>Ind</b> | <b>Replica</b> | <b>(ng/μL) -<br/>eluição 1</b> | <b>Pureza -<br/>eluição 1</b> | <b>(ng/μL) -<br/>eluição 2</b> | <b>Pureza -<br/>eluição 2</b> | <b>Kit</b>          |
|--------------------|------------|----------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------------------|
| <i>A. edulis</i>   | 1          | a              | 107,7                          | 2,03                          | 5,4                            | 2,2                           | Quick RNA Plant     |
| <i>A. edulis</i>   | 1          | b              | 9,4                            | 1,33                          | 7,4                            | 1,23                          | Quick RNA Plant     |
| <i>A. edulis</i>   | 2          | a              | 9,3                            | 1,54                          | 3,9                            | 1,86                          | Quick RNA Plant     |
| <i>A. edulis</i>   | 2          | b              | 16,2                           | 1,35                          | 8,1                            | 0,97                          | Quick RNA Plant     |
| <i>A. edulis</i>   | 2          | c              | 13,2                           | 1,24                          | 8,6                            | 1,34                          | Quick RNA Plant     |
| <i>A. edulis</i>   | 3          | a              | 3,5                            | 1,1                           | 2,4                            | 1,86                          | Quick RNA Plant     |
| <i>A. edulis</i>   | 4          | a              | 13                             | 1,76                          | 4,9                            | 2,13                          | Quick RNA Plant     |
| <i>A. edulis</i>   | 4          | b              | 4,3                            | 1,33                          | 5,5                            | 1,27                          | Quick RNA Plant     |
| <i>A. edulis</i>   | 5          | a              | 6                              | 2,01                          | 3,9                            | 2,08                          | Quick RNA Plant     |
| <i>A. edulis</i>   | 5          | b              | 20,8                           | 1,29                          | 22,6                           | 1,2                           | Quick RNA Plant     |
| <i>A. edulis</i>   | 1          | a              | 110,5                          | 1,84                          | 78,7                           | 1,82                          | Quick RNA Mini Prep |
| <i>A. edulis</i>   | 2          | a              | 142                            | 1,8                           | 53                             | 1,77                          | Quick RNA Mini Prep |
| <i>A. edulis</i>   | 5          | a              | 58,1                           | 1,69                          | 42,7                           | 1,68                          | Quick RNA Mini Prep |
| <i>A. edulis</i>   | 4          | a              | 109,2                          | 1,86                          | 56,2                           | 1,86                          | Quick RNA Mini Prep |
| <i>A. edulis</i>   | 3          | c              | 16,1                           | 2,61                          | 15,1                           | 2,0                           | Quick RNA Mini Prep |
| <i>C. vernalis</i> | 1          | c              | 35,6                           | 2,02                          | 5,7                            | 1,84                          | Quick RNA Mini Prep |
| <i>C. vernalis</i> | 2          | a              | 39,5                           | 2,01                          | 6,8                            | 1,97                          | Quick RNA Mini Prep |
| <i>C. vernalis</i> | 3          | a              | 52,1                           | 2,07                          | 8,6                            | 2                             | Quick RNA Plant     |
| <i>C. vernalis</i> | 3          | b              | 47,9                           | 1,98                          | 22,1                           | 1,97                          | Quick RNA Plant     |
| <i>C. vernalis</i> | 4          | a              | 33,4                           | 1,91                          | 6,6                            | 2,09                          | Quick RNA Plant     |
| <i>C. vernalis</i> | 4          | b              | 20,2                           | 1,95                          | 4,2                            | 1,84                          | Quick RNA Plant     |
| <i>C. vernalis</i> | 5          | a              | 53,6                           | 1,99                          | 11,5                           | 2,11                          | Quick RNA Plant     |
| <i>C. vernalis</i> | 5          | b              | 8,8                            | 1,89                          | 4,1                            | 1,97                          | Quick RNA Plant     |

|                           |    |   |       |      |      |      |                     |
|---------------------------|----|---|-------|------|------|------|---------------------|
| <i>C. vernalis</i>        | 5  | c | 30,3  | 1,96 | 12,1 | 2,05 | Quick RNA Plant     |
| <i>C. vernalis</i>        | 1  | a | 28,1  | 2,14 |      |      | Quick RNA Plant     |
| <i>C. vernalis</i>        | 1  | b | 70,7  | 1,93 |      |      | Quick RNA Plant     |
| <i>G. kunthiana</i>       | 1  | a | 24,7  | 2,04 | 7,5  | 1,9  | Quick RNA Plant     |
| <i>G. kunthiana</i>       | 1  | b | 43,6  | 1,91 | 11,6 | 1,91 | Quick RNA Plant     |
| <i>G. kunthiana</i>       | 2  | a | 16,4  | 2,01 | 4,4  | 2,19 | Quick RNA Plant     |
| <i>G. kunthiana</i>       | 2  | b | 14,5  | 1,93 | 12,8 | 1,44 | Quick RNA Plant     |
| <i>G. kunthiana</i>       | 3  | a | 25,5  | 1,43 | 4,8  | 1,54 | Quick RNA Plant     |
| <i>G. kunthiana</i>       | 4  | a | 72,6  | 1,44 | 37,1 | 1,4  | Quick RNA Plant     |
| <i>G. kunthiana</i>       | 5  | a | 45,4  | 1,91 | 8,4  | 1,98 | Quick RNA Plant     |
| <i>L. hasslerianum</i>    | 1  | a | 14,8  | 2,2  | 4,3  | 2,3  | Quick RNA Plant     |
| <i>L. hasslerianum</i>    | 1  | b | 41,7  | 1,87 | 12,5 | 1,7  | Quick RNA Plant     |
| <i>L. hasslerianum</i>    | 2  | a | 79    | 2,05 | 14,5 | 2,11 | Quick RNA Plant     |
| <i>L. hasslerianum</i>    | 2  | b | 40    | 1,7  | 36,3 | 1,37 | Quick RNA Mini Prep |
| <i>L. hasslerianum</i>    | 3  | a | 42,2  | 2,03 | 19   | 2,03 | Quick RNA Mini Prep |
| <i>L. hasslerianum</i>    | 4  | a | 46,8  | 1,95 | 12,6 | 2,03 | Quick RNA Mini Prep |
| <i>L. hasslerianum</i>    | 5  | a | 63,3  | 1,96 | 18,1 | 1,92 | Quick RNA Mini Prep |
| <i>P. glabrata</i>        | 1  | a | 7,6   | 1,98 | 5,1  | 2,06 | Quick RNA Plant     |
| <i>P. glabrata</i>        | 1  | b | 151,8 | 2,03 | 14,2 | 2    | Quick RNA Mini Prep |
| <i>P. glabrata</i>        | 2  | a | 80,1  | 2,01 | 16,2 | 2,05 | Quick RNA Plant     |
| <i>P. glabrata</i>        | 2  | b | 255,7 | 2,02 | 25,5 | 1,91 | Quick RNA Mini Prep |
| <i>P. glabrata</i>        | 3  | a | 96,6  | 2,03 | 15,6 | 2,14 | Quick RNA Plant     |
| <i>P. glabrata</i>        | 3  | b | 80,8  | 2    | 26,2 | 1,88 | Quick RNA Mini Prep |
| <i>P. glabrata</i>        | 4  | a | 161,2 | 1,96 | 25,6 | 1,91 | Quick RNA Mini Prep |
| <i>P. glabrata</i>        | 5  | a | 230,7 | 1,96 | 17,7 | 1,99 | Quick RNA Mini Prep |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 4  | a | 13,6  | 0,89 | 61,9 | 0,92 | Kit Qiagen          |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 1  | a | 27,9  | 0,96 | 10,0 | 1,08 | Kit Qiagen          |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 10 | a | 25,6  | 1,03 | 23,2 | 0,99 | Kit Qiagen          |



|                           |      |   |      |      |      |      |                     |
|---------------------------|------|---|------|------|------|------|---------------------|
| <i>S. terebinthifolia</i> | 1    | a | 28.4 | 0.82 | 16.4 | 1.03 | Kit Qiagen          |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 1    | c | 18   | 1,58 | 7    | 1,42 | Quick RNA Mini Prep |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 2    | a | 3,1  | 1,68 | 1,1  | 1,88 | Quick RNA Plant     |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 2    | b | 12,2 | 1,69 | 6,1  | 1,71 | Quick RNA Plant     |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 2    | c | 6    | 1,01 | 3    | 0,89 | Quick RNA Mini Prep |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 3    | a | 6,5  | 2,07 | 3,4  | 2,1  | Quick RNA Plant     |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 3    | b | 7,7  | 1,46 | 3,1  | 1,78 | Quick RNA Plant     |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 3    | c | 7,7  | 0,97 | 2,7  | 0,92 | Quick RNA Mini Prep |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 4    | a | 6    | 1,73 | 2    | 1,74 | Quick RNA Plant     |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 4    | b | 19,1 | 1,63 | 9,6  | 1,55 | Quick RNA Plant     |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 4    | c | 5,1  | 1,03 | 4,8  | 0,95 | Quick RNA Mini Prep |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 5    | a | 12,1 | 1,84 | 3,9  | 2,14 | Quick RNA Plant     |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 5    | b | 2,7  | 1,09 | 1    | 0,89 | Quick RNA Mini Prep |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 1    | a | 2,9  | 1,75 | 1,6  | 1,65 | Quick RNA Mini Prep |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 1    | a | 20,7 | 1,84 | 3,1  | 1,75 | Quick RNA Mini Prep |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 5    | a | 24,9 | 1,32 | 10,6 | 1,5  | Quick RNA Mini Prep |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 7    | a | 27   | 1,47 | 25,8 | 1,45 | Quick RNA Mini Prep |
| <i>S. terebinthifolia</i> | C217 | a | 4,4  | 2,2  | 1,4  | 1,76 | Quick RNA Mini Prep |
| <i>S. terebinthifolia</i> | C29  | a | 4,3  | 1,51 | 5    | 1,51 | Quick RNA Mini Prep |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 1    | a | 40,4 | 1,58 | -    | -    | Quick RNA Plant     |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 1    | b | 89,6 | 1    | -    | -    | Quick RNA Plant     |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 2    | a | 4.0  | 1.34 | -    | -    | Kit Qiagen          |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 1    | a | 4.8  | 2.08 | -    | -    | Kit Qiagen          |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 2    | a | 4.6  | 2.30 | -    | -    | Protocolo Wani      |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 1    | a | 1.5  | 1.82 | -    | -    | Protocolo Wani      |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 2    | a | 1.9  | 1.73 | -    | -    | Protocolo Wani      |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 3    | a | 0.8  | 2.4  | -    | -    | Protocolo Wani      |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 4    | a | 1.5  | 2.58 | -    | -    | Protocolo Wani      |

|                           |         |     |        |       |   |   |                  |
|---------------------------|---------|-----|--------|-------|---|---|------------------|
| <i>S. terebinthifolia</i> | 1       | b   | 0.2    | 1.11  | - | - | Protocolo Wani   |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 2       | b   | 1.0    | 1.71  | - | - | Protocolo Wani   |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 3       | b   | 2.4    | 1.63  | - | - | Protocolo Wani   |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 4       | b   | 1.9    | 1.38  |   | - | Protocolo Wani   |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 11      | a   | 1.5    | 0.87  |   | - | Protocolo Wani   |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 11      | a   | 1.1    | 3.05  | - | - | Protocolo Wacker |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 11      | a   | 0.8    | 18.13 | - | - | Protocolo Wacker |
| <i>S. terebinthifolia</i> | teste_1 | a   | 678.3  | 0.79  | - | - | Protocolo Wacker |
| <i>S. terebinthifolia</i> | teste_2 | a   | 267.2  | 0.80  | - | - | Protocolo Wacker |
| <i>S. terebinthifolia</i> | teste_3 | a   | 1168.7 | 0.77  | - | - | Protocolo Wacker |
| <i>S. terebinthifolia</i> | teste_4 | a   | 246.8  | 0.74  | - | - | Protocolo Wacker |
| <i>S. terebinthifolia</i> | teste_5 | a   | 1075.9 | 0.76  | - | - | Protocolo Wacker |
| <i>S. terebinthifolia</i> | teste_6 | a   | 1053.8 | 0.71  | - | - | Protocolo Wacker |
| <i>S. terebinthifolia</i> | teste_7 | a   | 2160.2 | 0.75  | - | - | Protocolo Wacker |
| <i>S. terebinthifolia</i> | teste_8 | a   | 1410.1 | 0.76  | - | - | Protocolo Wacker |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 4       | a_1 | 876.7  | 1.27  | - | - | Protocolo Wacker |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 4       | a_1 | 1069.1 | 1.49  | - | - | Protocolo Wacker |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 4       | a_1 | 1089.5 | 1.31  | - | - | Protocolo Wacker |
| <i>S. terebinthifolia</i> | 4       | b_1 | 50.6   | 1.55  | - | - | Protocolo Wacker |

Nota: (-) ausência de eluição 2 e pureza 2. As extrações de RNA de *S. terebinthifolia*, nos testes utilizando os protocolos de Wani et al. 2022 e Wacker e Godard 2005 foram obtidas por eluições única.