

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE RNA APLICADOS A CULTURAS AMILÁCEAS UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE ETANOL: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Comparison of RNA Extraction Methods Applied to Amilaceous Crops Used in Ethanol Production: A bibliographic review

Comparación de Métodos de Extracción de ARN Aplicados a Los Cultivos Amiláceos Utilizados en la Producción de Etanol: Una revisión bibliográfica



Revista
Desafios

Artigo Original
Original Article
Artículo Original

Micaele Rodrigues de Souza^{*1}, Gabriel Duarte de Oliveira¹, Ana Elisa Esteves dos Santos², Solange Aparecida Ságio¹

¹Laboratório de Análises Moleculares, Programa de Pós-Graduação em Agroenergia, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, Tocantins, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Agroenergia, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, Tocantins, Brasil.

*Correspondência: Laboratório de Análises Moleculares, Universidade Federal do Tocantins, Av. NS 15, 109 Norte, Palmas, Tocantins, Brasil. CEP: 77010-090. E-mail: micaele.souzasp@gmail.com

Artigo recebido em 23/01/2020 aprovado em 12/05/2020 publicado em 29/08/2020.

RESUMO

A crescente preocupação com os efeitos provenientes do uso de combustíveis fósseis, em razão de sua grande dependência, tem proporcionado, nas últimas décadas, estudos mais intensos sobre biocombustíveis, bem como a diversificação de matérias-primas. Atualmente, o maior produtor mundial de etanol são os Estados Unidos, e a matéria-prima majoritária utilizada é a cultura do milho. Entretanto tem-se buscado maior diversificação de matérias-primas, intensificando-se os estudos voltados para culturas como a mandioca e a batata-doce. Visando à obtenção de cultivares com alto potencial energético, a engenharia genética é considerada uma ferramenta indispensável, já que o melhoramento tradicional tem sido um desafio para diversas culturas. Entre as várias técnicas aplicadas, estão os estudos moleculares transcricionais, que possuem, como primeira etapa, a extração do ácido ribonucleico, o qual é um fator limitante em análises moleculares, por ser a base para os estudos posteriores. Nesta revisão, consta um levantamento dos métodos mais empregados ao isolamento do ácido ribonucleico das culturas do milho, mandioca e batata-doce e uma análise de custo/benefício. Conclui-se que o método menos dispendioso e que mantém qualidade e quantidade do material são os protocolos que tiveram suas adaptações a partir do método de Brometo de Cetrimônio.

Palavras-chave: Etanol. Protocolos. Agroenergia.

ABSTRACT

The growing concern with the effects from the use of fossil fuels, due the big dependence of them, has provided in the last two decades more intense studies about biofuels, as well as the diversification of raw material. Nowadays the biggest world ethanol producer is the United States and the majority raw material used for this purpose is the corn crop. However, it has been generally sought a bigger diversification of raw materials, stepping up the studies focused

on crops like cassava and sweet potato. Aiming the obtaining of cultivars with high energy potencial, the genetic engineering can be considered an indispensable tool, once that the traditional improvement has been a challenge for diverse crops. Among the various techniques applied, are the transcriptional molecular studies, that have as the first step the extraction of the ribonucleic acid, this being a limiting factor in molecular analysis, as the basis for further studies. In this review appears a survey of the most employed methods for the ribonucleic acid isolation of corn, cassava and sweet potato crops and an analysis of cost and benefit. Being possible to conclude that the least expensive method and that maintains the quality and quantity of material are the protocols that had their adaptations from the method of hexadecyltrimethylammonium bromide.

Keywords: Ethanol. Protocols. Agroenergy.

RESUMEN

La creciente preocupación con los efectos resueltos del uso de combustibles fósiles, debido a la gran dependencia de ellos, ha proporcionado estudios de biocombustibles más intensos en las últimas décadas, así como la diversificación de materias primas. Actualmente, el mayor productor mundial de etanol es Estados Unidos y la principal materia prima utilizada para este propósito es la cosecha de maíz. Sin embargo, se ha buscado una mayor diversificación de las materias primas, intensificando estudios centrados en cultivos como la yuca y la batata dulce. Con el objetivo de obtener cultivares con alto potencial energético, la ingeniería genética se considera una herramienta indispensable, Como la cría tradicional ha sido un desafío para muchas culturas. Entre las diversas técnicas aplicadas, están los estudios moleculares transcripcionales, que tienen como primer paso la extracción de ribonucleic acid, este es un factor limitante en el análisis molecular, ya que es la base para futuros estudios. Esta revisión contiene una encuesta de los métodos más utilizados para aislar el ribonucleic acid de los cultivos de maíz, yuca y batata y un análisis de costo / beneficio. En conclusión, el método menos costoso que mantiene la calidad y cantidad de material Estos son los protocolos que tuvieron sus adaptaciones basadas en el método Bromuro de cetrimonio.

Palabra clave: Etanol. Protocolos. Agroenergía.

INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas, a abordagem sobre biocombustíveis tem sido crescente e, em consequência, os estudos voltados a culturas energéticas. Tal fato se dá por três pontos, que, segundo a literatura, são cruciais, para o apoio ao desenvolvimento de biocombustíveis: 1º: os biocombustíveis prometem fontes renováveis para as estratégias de descarbonização; 2º os biocombustíveis podem reduzir a dependência de combustíveis fósseis e 3º: os biocombustíveis podem melhorar as economias marginais locais pela adoção de novas tecnologias, tornando possível reavaliar as terras

marginais (Fierro *et al.*, 2019). As matérias-primas adotadas, para a produção de etanol, são classificadas em: biomassa açucarada, biomassa amilácea e biomassa celulósica. Atualmente o maior produtor mundial de etanol são os Estados Unidos, e a matéria-prima majoritária utilizada para este fim é a cultura do milho (*Zea mays*), que é uma biomassa amilácea (Bertrand *et al.*, 2016).

Entretanto tem-se buscado, de maneira geral, maior diversificação de matérias-primas por proporcionarem a descentralização da produção, o que permite maior participação do pequeno agricultor, além de influenciar diretamente no custo final do produto

(Mei e Rakhmatov, 2014; Silveira *et al.*, 2014). Outro aspecto que tem incentivado a busca por diferentes matérias-primas é o fato do monocultivo gerar prejuízos, como um aumento na prevalência de pragas e doenças e o esgotamento dos estoques de nutrientes do solo de maneira precoce (FAO, 2016; Septia *et al.*, 2018).

O emprego de culturas, como a mandioca (*Manihot esculenta*) e a batata-doce (*Ipomoea batatas*), tem sido estudado com o intuito de viabilizar a sua aplicação nesta cadeia produtiva e reduzir a dependência de culturas como o milho (Ziska *et al.*, 2009; Silveira *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016; Blank *et al.*, 2017; Lourenço *et al.*, 2018).

A aplicação da cultura da mandioca à produção de etanol tem por objetivo central possibilitar a participação da agricultura familiar, nessa cadeia produtiva, assim como a batata-doce pelo seu desenvolvimento, em regiões de baixa produtividade, sendo considerada uma das culturas mais baratas e sustentáveis (Zhang *et al.*, 2016). Estudos sobre o custo energético da produção agrícola e industrial de um litro de etanol, a partir desta cultura, indicam que a mandioca apresenta características significativas e até mesmo superiores em relação a outras fontes energéticas (Cabello, 2006; Sala *et al.*, 2010).

A cultura da batata-doce também se mostra como uma opção interessante, sobretudo, por sua utilização nos períodos da entressafra da cana-de-açúcar e do milho (Silveira *et al.*, 2014; Vieira *et al.*, 2015; Camargo *et al.*, 2016; Lourenço *et al.*, 2018).

Todavia alguns gargalos precisam ser solucionados para a viabilidade do uso dessas culturas na produção de etanol. Dessa forma, as técnicas de biotecnologia têm se apresentado como alternativas eficientes para o desenvolvimento de plantas com alto valor agregado para a agricultura ou indústria. Na agricultura, em especial, a engenharia genética pode ser considerada uma ferramenta básica à obtenção de cultivares com alto potencial energético (CIB, 2017). O

melhoramento tradicional tem sido um desafio, para diversas culturas, como é o caso da mandioca, que apresenta alta heterozigosidade (Chavarriaga-Aguirre *et al.*, 2016).

Entre as diversas técnicas aplicadas a este fim, os estudos moleculares transcricionais juntamente com a transformação genética são amplamente empregados, porque podem possibilitar o aumento na produção de amido, por expressão de determinados genes (Ligaba-Osena *et al.*, 2018). A primeira etapa de estudos transcricionais é a extração do ácido ribonucleico (RNA), o qual é um fator limitante, em análises moleculares, por ser a base para estudos posteriores (Liu *et al.*, 2018). Diante disso, é imprescindível que o processo de extração aconteça de forma eficiente para se obter resultados consistentes (Zhu, *et al.*, 2017; Ahmad *et al.*, 2017).

A pureza da amostra de RNA é comumente determinada, utilizando-se, como parâmetros, a relação A260/A280 para a contaminação por proteínas e a relação A260/A230 para a contaminação por polissacarídeos e polifenóis, tendo como valores ideais o intervalo entre 1,8 – 2,0. E a integridade desse material pode ser verificada, por meio de gel de agarose, sendo que o método aplicado, para a extração do material genético, pode interferir tanto na pureza como na integridade das amostras (Liu *et al.*, 2018).

Por isso, o objetivo deste estudo foi realizar um levantamento de dados, por meio da plataforma *Web of Science*, quanto às metodologias utilizadas para a extração de RNA das culturas de milho, mandioca e batata-doce, indicando quais os métodos mais viáveis de acordo com os resultados relatados na literatura. Foram empregadas, na busca, as seguintes palavras-chave: RNA, Protocols, RT-qPCR, nome comum (em inglês) e nome científico da cultura.

EXTRAÇÃO DE RNA

Milho

Para a cultura do milho, a busca resultou em um total de onze artigos (Tabela 1) relacionados à extração de RNA. Como observado, a metodologia

mais empregada foi a do reagente Trizol, entretanto a aplicação de kits também é usual.

Tabela 1 - Artigos que fizeram uso da técnica de extração de RNA de milho.

Artigo	Autores	Revista publicada	Protocolo de extração de RNA
Isolation and identification of a vegetative organ-specific promoter from maize.	Yu <i>et al.</i> , 2019.	Physiology and Molecular Biology of Plants	RNA isoplus kit (TaKaRa, Japão)
Long Non-Coding RNAs Responsive to Salt and Boron Stress in the Hyper-Arid Llueteño Maize from Atacama Desert	Huanca-Mamani <i>et al.</i> , 2018.	Genes	Trizol
In situ localization and changes in the expression level of transcripts related to intercellular transport and phloem loading in leaves of maize (<i>Zea mays</i> L.) treated with low temperature.	Bilska-Kos <i>et al.</i> , 2016.	Acta Physiologia e Plantarum	RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)
An improved method for extraction of high-quality total RNA from oil seeds.	Rayani e Nayeri, 2015.	Biotechnology Letters	Método modificado a partir do método proposto por Hou <i>et al.</i> (2011)
Isolation of high-quality rna from grains of different maize varieties.	Messias <i>et al.</i> , 2014.	Preparative Biochemistry & Biotechnology	CTAB adaptado; PureLink; Trizol; Nucleo Spin RNA Plant (Macherey-Nagel); Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma Aldrich) e RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)
Reverse Transcription of 18S rRNA with Poly(dT) ₁₈ and Other Homopolymers.	Bogdanović <i>et al.</i> , 2013.	Plant Molecular Biology Reporter	Trizol
Differential gene expression during somatic embryogenesis in the maize (<i>Zea mays</i> L.) inbred line H99.	Sun <i>et al.</i> , 2012.	Plant Cell Tiss Organ Cult	Kit RNA iso Reagent (Takara, Japão)
Genome-wide identification, classification, and analysis of two-component signal system genes in maize.	Chu <i>et al.</i> , 2011	Genetics and Molecular Research	Reagent Takara Biotechnology, Otsu, Japan
Isolation, expression and functional analysis of a putative RNA-dependent	He <i>et al.</i> , 2010	Molecular Biologyreports	Trizol

RNA polymerase gene from maize (<i>Zea mays</i> L.)	Rosati <i>et al.</i> , 2008	Plant Molecular Biology	Plant RNA extraction kit (Macherey–Nagel, M-Medical, Italy)
Characterisation of 3' transgene insertion site and derived mRNAs in MON810 YieldGard® maize.	Zheng <i>et al.</i> , 2004	Plant Molecular Biology	Método fenol (Kay <i>et al.</i> , 1987)
Isolation and analysis of water stress induced genes in maize seedlings by subtractive PCR and cDNA microarray.			

Fonte: Dados da pesquisa

A diversidade de métodos empregados possibilitou a comparação de cada um deles em relação ao custo/amostra. Como os dados de qualidade e quantidade não são disponibilizados, em sua maioria, espera-se que os RNAs extraídos e utilizados, nos estudos listados, estejam dentro dos parâmetros de qualidade e integridade.

A variação de custo entre os métodos empregados foi de R\$1,92 a 43,04/ amostra (dados obtidos, por meio do site das empresas, que comercializam os reagentes/kits e por cotações). Considerando que um experimento não se baseia em apenas uma amostra, é possível afirmar que o custo aumenta, proporcionalmente, ao número de amostras a serem analisadas. O protocolo correspondente ao menor custo foi o do Brometo de Cetrimônio (CTAB), modificado, que, de acordo com Messias *et al.*, (2014), permitiu a extração de um RNA puro, dentro dos parâmetros necessários, bem como concentrações

ideais de RNA para posteriores estudos de expressão gênica. Neste estudo, Messias e colaboradores (2014) avaliaram também alguns kits comerciais que foram utilizados por outros autores, em estudos mostrados na Tabela 1, chegando à conclusão de que, apesar da recomendação desses kits ao isolamento de RNA de diversos tecidos vegetais, o seu uso resultou na contaminação por polifenóis e polissacarídeos, limitando, assim, a sua utilização. Quanto ao custo do Trizol, de acordo com o site da empresa Thermo Fisher, é de R\$ 8,34/ amostra, sendo este o método mais utilizado.

Mandioca

Para a cultura da mandioca, foram contabilizados dez trabalhos, com a maior variação de métodos empregados entre as culturas em estudo (Tabela 2).

Tabela 2- Artigos que fizeram uso da técnica de extração de RNA de mandioca.

Artigo	Autores	Revista publicada	Protocolo de extração de RNA
An optimized method to obtain high-quality RNA from cassava storage root	Guan <i>et al.</i> , 2019	3 Biotech	Método de TM modificado
An optimized isolation protocol yields high-quality RNA from cassava tissues (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	Behnam <i>et al.</i> , 2019	Febs Open Bio	Chang <i>et al.</i> (1993) modificado
Novel Bioengineered Cassava Expressing an Archaeal Starch			

Degradation System and a Bacterial ADP-Glucose Pyrophosphorylase for Starch Self-Digestibility and Yield Increase	Ligaba-Osena <i>et al.</i> , 2018	Frontiers in Plant Science	Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma)
A time series transcriptome analysis of cassava (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) varieties challenged with Ugandan cassava brown streak virus	Amuge <i>et al.</i> , 2017	Scientific Reports	CTAB
A Virus-Derived Stacked RNAi Construct Confers Robust Resistance to Cassava Brown Streak Disease	Beyene <i>et al.</i> , 2017	Frontiers in Plant Science	Trizol
Sequences enhancing cassava mosaic disease symptoms occur in the cassava genome and are associated with South African cassava mosaic virus infection	Maredza <i>et al.</i> , 2016	Molecular Genetics and Genomics	Tri-Reagent (Sigma, EUA) ou Purezol (Bio-Rad, EUA)
High-resolution identification and abundance profiling of cassava (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) microRNAs	Khatab <i>et al.</i> , 2016	BMC GENOMICS	Trizol e CTAB
Gene expression of beta carotene genes in transgenic biofortified cassava	Telengech <i>et al.</i> , 2014	3 Biotech	Dellaporta modificado (1983)
Formamide based RNA Isolation at Above ZeroTemperatures from High Starch Cassava Tubers	Bowrin <i>et al.</i> , 2013	Phytochemical Analysis	Á base de formamida
A reliable and efficient method for total rna isolation from various members of spurge family (Euphorbiaceae)	Xu <i>et al.</i> , 2010	Phytochemical Analysis	CTAB modificado

Fonte: Dados da pesquisa

Neste estudo, a cultura da mandioca foi a que apresentou mais pesquisas voltadas ao estabelecimento de um método de extração de RNA eficiente.

Além de proporem modificações, no protocolo do CTAB, como foi feito para a cultura do milho, um dos estudos indica o uso do método de Tanupat Mornkham (TM) (Mornkham *et al.*, 2013), com

alterações, as quais utilizam os reagentes Trizol e clorofórmio com um volume duas vezes maior quando comparado ao método TM original (Guan *et al.*, 2019). Guan e colaboradores (2019) obtiveram, por meio desse método adaptado, uma variação nas análises espectrométricas, para as razões de A260/280 e A230/260 de 2,14-2,17 e 1,94-2,01, respectivamente, o

que indica alta qualidade do RNA isolado. Contudo o fato de dobrar a quantidade de reagentes, como Trizol, eleva o custo das análises/amostra, o que torna inviável seu uso, ao se comparar com o método empregado por Behnam *et al.* (2019). Esses autores sugerem uma adaptação ao método de Chang *et al.* (1993), substituindo o reagente CTAB pelo Dodecil sulfato de sódio (SDS), que torna ainda mais barato o custo por amostra que o protocolo original do CTAB, mantendo a eficiência.

No método proposto por Behnam *et al.* (2019), foram obtidos valores semelhantes ao estudo de Guan *et al.* (2019), resultando em valores de 2,02-2,2 para a relação de A260/280 e para a relação A230/260 2,03-

2,29. Assim, ambos os protocolos empregados atendem o quesito de qualidade quanto à ausência de contaminantes. Entretanto as concentrações de RNA (ng/μL) fornecidas são mais elevadas, no protocolo apresentado por Behnam *et al.* (2019), o que juntamente com o custo, torna mais viável o seu emprego.

Batata-doce

Para a cultura da batata-doce, a pesquisa resultou em apenas sete artigos (Tabela 3), em que, aproximadamente, 50% das pesquisas utilizaram o reagente Trizol para a extração de RNA.

Tabela 3-Artigos que fizeram uso da técnica de extração de RNA de batata-doce.

Artigo	Autores	Revista publicada	Protocolo de extração de RNA
Isolation, Expression Analysis, and Function Evaluation of 12 Novel Stress-Responsive Genes of NAC Transcription Factors in Sweet potato	Meng <i>et al.</i> , 2018	Crop Science	Trizol
Identification of viruses infecting sweet potato in southern China by small RNA deep sequencing and PCR detection	Ma <i>et al.</i> , 2018	Journal of General Plant Pathology	Trizol
Exploring the Polyadenylated RNA Virome of Sweet Potato through High-Throughput Sequencing	Guet <i>et al.</i> , 2014	Plos One	Trizol
Downregulation of the lycopene ϵ -cyclase gene increases carotenoid synthesis via the β -branch-specific pathway and enhances salt-stress tolerance in sweet potato transgenic calli	Kim <i>et al.</i> , 2012	Physiologia Plantarum	Kit Easy-Spin™ (iNtRON, Daejeon, Korea)
Expression of a cloned sweet potato catalase <i>SPCAT1</i> alleviates ethephon-mediated leaf senescence and H ₂ O ₂ elevation	Chen <i>et al.</i> , 2012	Journal of Plant Physiology	Método de Sambrook <i>et al.</i> (1989)
Methods for detection and differentiation of existing and new	Wintermantel <i>et al.</i> , 2010	Journal of Virological Methods	RNeasy Plant Mini Kit

An Improved Method of Isolation of High Quality Total RNA from Purple-Fleshed Sweet Potato, <i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam	Zhou <i>et al.</i> , 2009	Preparative Biochemistry & Biotechnology	CTAB modificado
---	---------------------------	--	-----------------

Fonte: Dados da pesquisa

Igualmente ao encontrado, para as culturas anteriores, umas das pesquisas relatadas, para a batata-doce, teve por objetivo a determinação e otimização de um método de extração de RNA. Esse estudo atestou ter desenvolvido, por meio da modificação do protocolo CTAB, um método rápido e confiável para o isolamento do material genético (Zhou *et al.*, 2009).

Contudo, entre as pesquisas listadas na Tabela 3, é possível observar que o método proposto por Zhou e colaboradores (2009) é o mais antigo e, mesmo assim, o protocolo mais comum, nas publicações mais recentes, é o do reagente Trizol. Reagente este que também foi utilizado, no estudo de Zhou *et al.* (2009), juntamente com outros métodos como o SDS/Fenol. Todos esses protocolos resultaram em rendimentos e qualidades inferiores aos obtidas pelo método CTAB modificado. Essa ampla utilização do método Trizol, em estudos posteriores, pode ser explicada pelo fato de ser aplicado no estudo de Zhou *et al.* (2009) uma macroextração com o protocolo do CTAB, que é um tipo de extração que demanda uma quantidade de material superior à extração normalmente utilizada. Esse fato pode ter levado os autores posteriores a não fazer o seu uso.

Em relação aos custos da extração de RNA, quando submetida à utilização de kits, o que teve a maior custo foi RNeasy Plant Mini Kit, com um valor de R\$ 43,04/amostra.

CONCLUSÃO

O levantamento dos métodos empregados, para a extração de RNA das culturas de milho, mandioca e

batata-doce, possibilitou uma comparação dos resultados e uma análise de custo. Observou-se que, por mais oneroso que seja, é comum o uso de kits, por serem procedimentos mais simples e rápidos que os outros métodos, além de garantir a qualidade e rendimento do material isolado. Em geral o método menos dispendioso e que mantém a qualidade e quantidade de RNA são os protocolos que tiveram suas adaptações a partir do método de CTAB.

AGRADECIMENTO

Agradecemos à Universidade Federal do Tocantins.

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, J.; BAIG, M. A.; ALI, A. A.; AL-HUQAIL, A.; IBRAHIM, M. M.; QURESHI, M. I. Comparative assessment of four RNA extraction methods and modification to obtain high-quality RNA from *Parthenium hysterophorus* leaf. **3 Biotech**, v. 7, 2017.
- AMUGE, T.; BERGER, D. K.; KATARI, M. S.; MYBURG, A. A.; GOLDMAN, S.L. A time series transcriptome analysis of cassava (*Manihotesculenta* Crantz) varieties challenged with Ugandan cassava brown streak virus. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 9747, 2017.
- BEHNAM, B.; BOHORQUEZ-CHAUX, A.; CASTANEDA-MENDEZ, O. F.; TSUJI H.; ISHITANI, M.; LOPEZ-LAVALLE, L. A. B. An optimized isolation protocol yields high-quality RNA from cassava tissues (*Manihotesculenta* Crantz). **FEBS Open Bio**, v. 9, n. 4, p. 814-825, 2019.

- BERTRAND, E.; VANDENBERGHE, L.; SOCOL, C. R.; SIGOILLOT, J. C.; FAULDS, C. F. generation bioethanol. In: **Green Fuels Technology**. Springer, Cham. p. 175-212, 2016.
- BEYENE, G.; CHAUHAN, R. D.; ILYAS, M.; WAGABA, H.; FAUQUET, C. M.; MIANO, D.; ALICAI, T.; TAYLOR, N. J. A virus-derived stacked RNAi construct confers robust resistance to cassava brown streak disease. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 2052, 2017.
- BILSKA-KOS, A.; GRZYBOWSKI, M.; JON'CZYK, M.; SOWIN'SKI, P. In situ localization and changes in the expression level of transcripts related to intercellular transport and phloem loading in leaves of maize (*Zea mays* L.) treated with low temperature. **Acta Physiologia e Plantarum**, v. 38, n. 5, p. 123, 2016.
- BLANK, A. F.; OLIVEIRA NETO, M. A. de.; FERNANDES, R. P. M.; ANDRADE, T. M.; OLIVEIRA, A. M. S. de.; LUZ, J. M. Q. *et al.* Performance of sweet potato clones for starch and ethanol in three regions of the state of Sergipe, Brazil. **Bioscience Journal**, 2017.
- BOGDANOVIĆ, M. D.; DRAGIĆEVIĆ, M. B.; TANIĆ, N. T.; TODOROVIĆ, S. I.; MIŠIĆ, D. M.; ŽIVKOVIĆ, S. T.; TISSIER, A.; SIMONOVIĆ, A. D. Reverse transcription of 18S rRNA with poly (dT) 18 and other homopolymers. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 31, n. 1, p. 55-63, 2013.
- BOWRIN, V.; ROUSE-MILLER, J.; SUTTONB, F.; SIRJU-CHARRANA, G. Formamide-based RNA Isolation at Above Zero Temperatures from High Starch Cassava Tubers. **Phytochemical Analysis**, v. 24, n. 1, p. 93-96, 2013.
- CABELLO, C. Produtos derivados de fécula de mandioca-etanol. In: Workshop sobre Tecnologias em Agroindústrias de Tuberosas Tropicais, Botucatu. **Anais Botucatu: UNESP**, v.4, p.02-06, 2006.
- CAMARGO, L. K. P.; RESENDE, J. T. V.; MÓGOR, Á. F.; CAMARGO, C. K.; KURCHAIDT, S. M. Use of selection index in identification of sweet potato genotypes with different aptitude. **Horticultura Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 514-519, 2016.
- CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 11, n. 2, p. 113-116, 1993.
- CHAVARRIAGA-AGUIRRE, P.; BRAND, A.; MEDINA, A.; PRÍAS, M.; ESCOBAR, R.; Juan Martinez.; DÍAZ, P.; LÓPEZ, C.; ROCA, W. M.; TOHME, J. The potential of using biotechnology to improve cassava: a review. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 52, n. 5, p. 461-478, 2016.
- CHEN, H. J.; WU, S. D.; HUANG, G. J.; SHEN, C. Y.; AFIYANTI, M.; LI, W. J.; LINC, Y. H. Expression of a cloned sweet potato catalase SPCAT1 alleviates ethephon-mediated leaf senescence and H₂O₂ elevation. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 1, p. 86-97, 2012.
- CHU, Z. X.; MA, Q.; LIN, Y. X.; TANG, X. L.; ZHOU, Y. Q.; ZHU, S. W.; FAN, J.; CHENG, B. J. Genome-wide identification, classification, and analysis of two-component signal system genes in maize. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 4, p. 3316-3330, 2011.
- CIB, Conselho de Informações sobre Biotecnologia. 2017. Biotecnologia e inovação: O futuro da agricultura em nossas mãos. **Agroanalysis**, p. 32-41.
- EPE, Empresa de Pesquisa Energética. 2016. Brazilian Energy Balance. Rio De Janeiro, Brasil.
- EPE, Empresa de Pesquisa Energética. 2018. Matriz Energética e Elétrica. Rio De Janeiro, Brasil.
- EPE, Empresa de Pesquisa Energéticas. 2016. O compromisso do Brasil no combate às mudanças climáticas: Produção e Uso de Energia-Nota Técnica. Rio De Janeiro, Brasil.
- FAO, Food and Agriculture Organization. 2016. Save and Grow: Cassava: 1. A 21st century crop.
- FIERRO, A. F.; ZUCARO, A.; MICERA, A. R. Multi-scale integrated assessment of second generation bioethanol for transport sector in the Campania Region. **Journal of Cleaner Production**, v. 217, p. 409-422, 2019.
- GU, Y. H.; TAO, X.; LAI, X. J.; WANG, H. Y.; ZHANG, Y. Z. Exploring the polyadenylated RNA virome of sweet potato through high-throughput sequencing. **PloS One**, v. 9, n. 6, p. 798-884, 2014.
- GUAN, L.; MA, X.; ZHOU, X.; TAN, B.; WANG, Z. Y. An optimized method to obtain high-quality RNA from cassava storage root. **3 Biotech**, v. 9, n. 4, p. 118, 2019.
- HE, J.; DONG, Z.; JIA, Z.; WANG, J.; WANG, G. Isolation, expression and functional analysis of a putative RNA-dependent RNA polymerase gene from maize (*Zea mays* L.). **Molecular Biology Reports**, v. 37, n. 2, p. 865, 2010.

HOU, P.; XIE, Z.; ZHANG, L.; SONG, Z.; MI, J.; HE, Y.; LI, Y. Comparison of three different methods for total RNA extraction from *Fritillaria unibracteata*: A rare Chinese medicinal plant. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 13, p. 2834-2838, 2011.

HUANCA-MAMANI, W.; ARIAS-CARRASCO, R.; CÁRDENAS-NINASIVINCHA, S.; ROJAS-HERRERA, M.; SEPÚLVEDA-HERMOSILLA, G.; CARIS-MALDONADO, J. C.; BASTÍAS, E.; MARACAJA-COUTINHO, V. Long non-coding RNAs responsive to salt and boron stress in the hyper-arid Iluteno maize from Atacama Desert. **Genes**, v. 9, n. 3, p. 170, 2018.

KHATABI, B.; ARIKIT, S.; XIA, R.; WINTER, S.; OUMAR, D.; MONGOMAKE, K.; MEYERS, B. C.; FONDONG, V. N. High-resolution identification and abundance profiling of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) micro RNAs. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 85, 2016.

KIM, S. H.; KIM, Y. H.; AHN, Y. O.; AHN, M. J.; JEONG, J. C.; LEE, H. S.; KWAK, S. S. Downregulation of the lycopene ϵ cyclase gene increases carotenoid synthesis via the β branch specific pathway and enhances salt stress tolerance in sweet potato transgenic calli. **Physiologia Plantarum**, v. 147, n. 4, p. 432-442, 2013.

LI, H.; LIU, Y.; GAO, X.; LI, X. Preparation and characterization of cassava starch based adsorbents for separating of azeotropic ethanol water in biofuels ethanol production. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 91, n. 4, p. 977-984, 2016.

LIGABA-OSENA, A.; JONES, J.; DONKOR, E.; CHANDRAYAN, S.; POLE, F.; WU, C. H.; VIEILLE, C.; ADAMS, M. W. W.; HANKOUA, B. B. Novel Bioengineered Cassava Expressing an Archaeal Starch Degradation System and a Bacterial ADP-Glucose Pyrophosphorylase for Starch Self-Digestibility and Yield Increase. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 192, 2018.

LIU, L.; HAN, R.; YU, N.; ZHANG, W.; XING, L.; XIE, D.; PENG, D. A method for extracting high-quality total RNA from plant rich in polysaccharides and polyphenols using *Dendrobium huoshanense*. **Plos One**, v. 13, n. 5, 2018.

LOPES M. L.; PAULILLO, S. C. de L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; AMORIM NETO, H. B. de; AMORIM, H. V. de. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64-76, 2016.

LOURENÇO, A. M.; TAVARES, A. T.; FERREIRA, T. A.; LOPES, D. A. da S. P.; CARLINE, J. V. G.; MOMENTÉ, V. G.; NASCIMENTO, I. R. do. Potential of experimental clones of sweet potato for ethanol production. **Nativa: Pesquisas Agrárias e Ambientais**, v. 6, n. 4, p. 352-357, 2018.

MA, S.; ZHENG, Q.; YE, J.; FENG, W.; ZHOU, G.; ZHANG, T.; Identification of viruses infecting sweet potato in southern China by small RNA deep sequencing and PCR detection. **Journal of General Plant Pathology**, v. 85, n. 2, p. 122-127, 2019.

MAREDZA, A. T.; ALLIE, F.; PLATA, G.; REY, M. E. C. Sequences enhancing cassava mosaic disease symptoms occur in the cassava genome and are associated with South African cassava mosaic virus infection. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 291, n. 3, p. 1467-1485, 2016.

MEI, C.; RAKHMATOV, C. Advances in the genetic manipulation of cellulosic bioenergy crops for bioethanol production. **Biological Conversion of Biomass for Fuels and Chemicals. Explorations from Natural Utilization Systems**, v. 10, p. 53-82, 2014.

MESSIAS, R. da S.; GALLI, V.; BUSS, H. J.; BOROWSKI, J. M.; NORA, L.; SILVA, S. D. dos A. e.; MARGIS, R.; ROMBALDI, C. V. Isolation of high-quality RNA from grains of different maize varieties. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, n. 7, p. 697-707, 2014.

MORNKHAM T.; WANGSOMNUK P. P.; FU, Y. B.; WANGSOMNUK, P.; JOGLOY, S.; PATANOTHAI, A. Extractions of high quality RNA from the seeds of Jerusalem artichoke and other plant species with high levels of starch and lipid. **Plants**, v. 2, n. 2, p. 302-316, 2013.

RAYANI, A.; NAYERI, F. D. An improved method for extraction of high-quality total RNA from oil seeds. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 4, p. 927-933, 2015.

ROSATI, A.; BOGANI, P.; SANTARLASCI, A.; BUIATTI, M. Characterisation of 3' transgene insertion site and derived mRNAs in MON810 YieldGard® maize. **Plant Molecular Biology**, v. 67, n. 3, p. 271-281, 2008.

SALLA, D. A.; FURLANETO, F. P.; CABELLO, C.; KANTHACK, R. A. Análise energética de sistemas de produção de etanol de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 4, p. 444-448, 2010.

- SEPTIA, E.; SUPRIADI, W.; SUWINARTI.; R AMIRTA. Characterization and ethanol potential from giant cassava (*Manihot esculenta*) stem waste biomass. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, p. 12 – 42, 2018.
- SILVEIRA, M. A.; SOUZA, F. R. de; ALVIM, T. da C.; DIAS, L. E.; SANTANA, W. R.; VITAL, M. de K. G. S.; GOUVÊA, G. R. dos S. R.; COSTA, D. M. da. A cultura da batata-doce como fonte de matéria-prima para produção de etanol. Palmas: UFT, **Boletim Técnico**, 44 p., 2014.
- SIVAMANI, S.; CHANDRASEKARAN, A. P.; BALAJI, M.; SHANMUGAPRAKASH, M.; HOSSEINI-BANDEGHARAEI, A.; BASKAR, R. Evaluation of the potential of cassava-based residues for biofuels production. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 17, n. 3, p. 553-570, 2018.
- SUN, L.; W. U, Y.; SU, S.; LIU, H.; YANG, G.; LI, S.; SHAN, X.; YUAN, Y. Differential gene expression during somatic embryogenesis in the maize (*Zea mays* L.) inbred line H99. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 109, n. 2, p. 271-286, 2012.
- TELENGECH, P. K.; MALING'A, J. N.; NYENDE, A. B.; GICHUKI, S. T.; WANJALA, B. W. Gene expression of beta carotene genes in transgenic biofortified cassava. **3 Biotech**, v. 5, n. 4, p. 465-472, 2015.
- VIEIRA, A. D.; MIRANDA, V. C.; ALVES, A. F.; TAVARES, A. T.; MOMENTÉ, V. G. Agronomic evaluation of clones of sweet potato with potential for ethanol production. **Applied Research & Agrotechnology**, v. 8, n. 1, p. 69-74, 2015.
- WINTERMANTEL, W. M.; HLADKY, L. L. Methods for detection and differentiation of existing and new crinivirus species through multiplex and degenerate primer RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 170, n. 1-2, p. 106-114, 2010.
- XU, J.; AILENI, M.; ABBAGANI, S.; ZHANG, P. A reliable and efficient method for total RNA isolation from various members of spurge family (Euphorbiaceae). **Phytochemical Analysis**, v. 21, n. 5, p. 395-398, 2010.
- YU, H. Q.; KHALID, M. H. B.; LU, F. Z.; SUN, F.; QU, J. T.; LIU, B. L.; LI, W. C.; FU, F. L. Isolation and identification of a vegetative organ-specific promoter from maize. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 25, n. 1, p. 277-287, 2019.
- ZISKA, L. H.; RUNION, B.; TOMECEK, M.; PRIOR, S.; TORBET, A.; SICHER, R. An evaluation of cassava, sweet potato and field corn as potential carbohydrate sources for bioethanol production in Alabama and Maryland. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 11, p. 1503-1508, 2009.
- ZHANG, M.; XIE, L.; YIN, Z.; KHANAL, S. K.; ZHOU, Q. Biorefinery approach for cassava-based industrial wastes: current status and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 50-62, 2016.
- ZHENG, J.; ZHAO, J.; TAO, Y.; WANG, J.; LIU, Y.; FU, J.; JIN, Y.; GAO, P.; ZHANG, J.; BAI, Y.; WANG, G. Isolation and analysis of water stress induced genes in maize seedlings by subtractive PCR and cDNA microarray. **Plant Molecular Biology**, v. 55, n. 6, p. 807-823, 2004.
- ZHOU, W.; GONG, Y.; FENG, Q.; GAO, F. An improved method of isolation of high quality total RNA from purple-fleshed sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 95-104, 2009.
- ZHU, H.; SUN, X.; LIU, D.; ZHENG, L.; CHEN, L.; MACCORRESPONDING, A. An Improved Total RNA Extraction Method for White Jelly Mushroom *Tremellafuciformis* Rich in Polysaccharides. **Mycobiology**, v. 45, n. 4, p. 434-437, 2017.