

# **Manual de instruções**

## **RGeasy**

## **Sumário**

|                                     |           |
|-------------------------------------|-----------|
| <b>1 Introdução</b>                 | <b>2</b>  |
| <b>2 Acesso ao banco de dados</b>   | <b>3</b>  |
| <b>3 Registro de Novas Espécies</b> | <b>5</b>  |
| 3.1 Registro de uma única espécie   | 5         |
| 3.2 Registro de mais de uma espécie | 8         |
| <b>Referências</b>                  | <b>10</b> |

## 1 Introdução

Bem-vindo ao RGeasy!

Este manual é um guia tanto para pesquisadores que buscam genes de referência validados, para análise de expressão gênica via RT-qPCR, como para aqueles que desejam registrar espécies (animal, vegetal e microrganismo), utilizadas em seus estudos de validação de genes de referência (Figura 1). Por meio do uso dessa ferramenta, o acesso e o desenvolvimento da pesquisa são simplificados, por proporcionar maior divulgação de dados, reduzir o uso de recursos financeiros e diminuir o tempo necessário para o desenvolvimento de cada estudo. Além disso, pela maior visibilidade dos estudos cadastrados no RGeasy, eles poderão ser mais citados que o usualmente, como explanado no decorrer do manual.

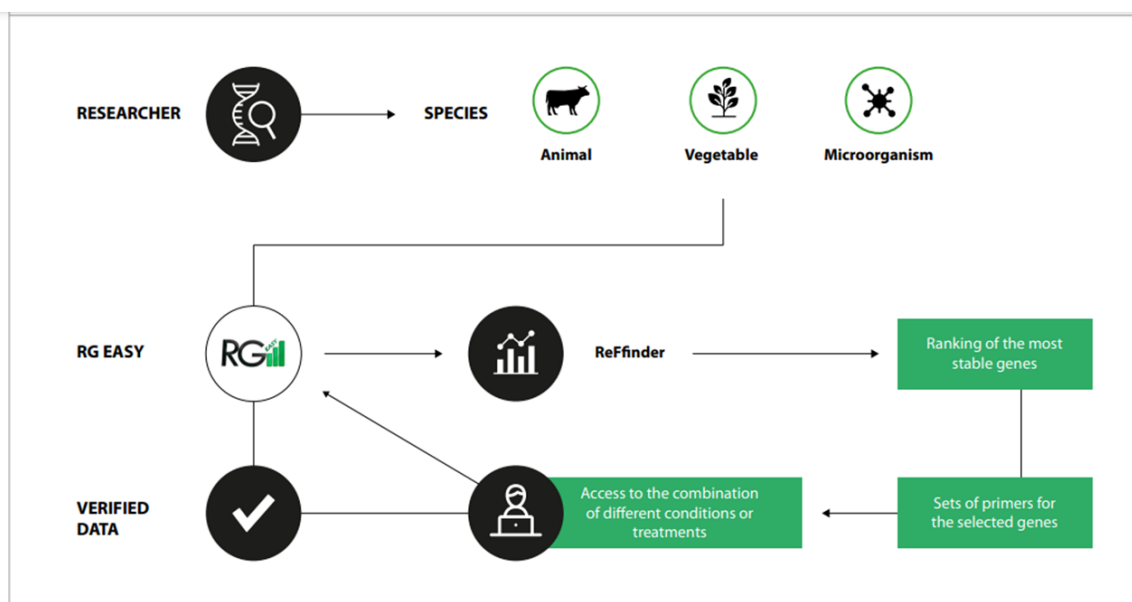


Figura 1- Manutenção e fluxo de trabalho do RGeasy. A partir do cadastro de espécies de animais, vegetais ou microrganismos, os pesquisadores disponibilizaram ao RGeasy dados, como os valores de Cq's, que são imediatamente verificados. A partir daí, são disponibilizadas ao público todas as combinações de condições/tratamentos possíveis para cada estudo. A nova combinação de tratamentos é ranqueada pelo ReFinder (XIE et al., 2012), e o RGeasy fornece, além do ranking com os genes de referência, um conjunto de *primers* validados para cada gene.

## 2 Acesso ao banco de dados

Ao utilizar o RGeasy, o usuário tem acesso às espécies registradas, clicando em “Species” na barra de navegação localizada na parte superior (Figura 2).

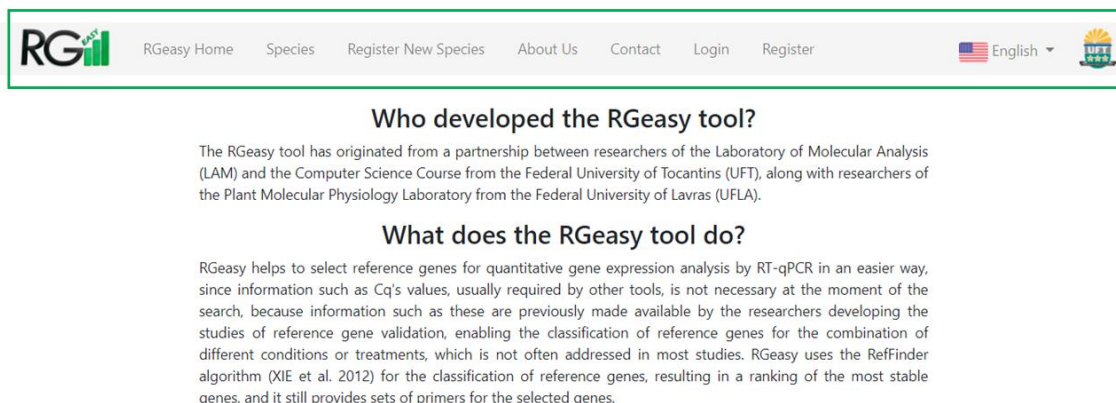


Figura 2- Interface gráfica inicial do RGeasy.

As espécies são separadas em três categorias: Animal, Plantas e Microrganismo (Figura 3). Ao clicar na espécie de interesse, são exibidos, automaticamente, todos os estudos de validação de genes de referência cadastrados. Nessa interface, o usuário tem acesso a cada estudo, clicando em seu nome e, abaixo de cada artigo, são exibidas as amostras analisadas.

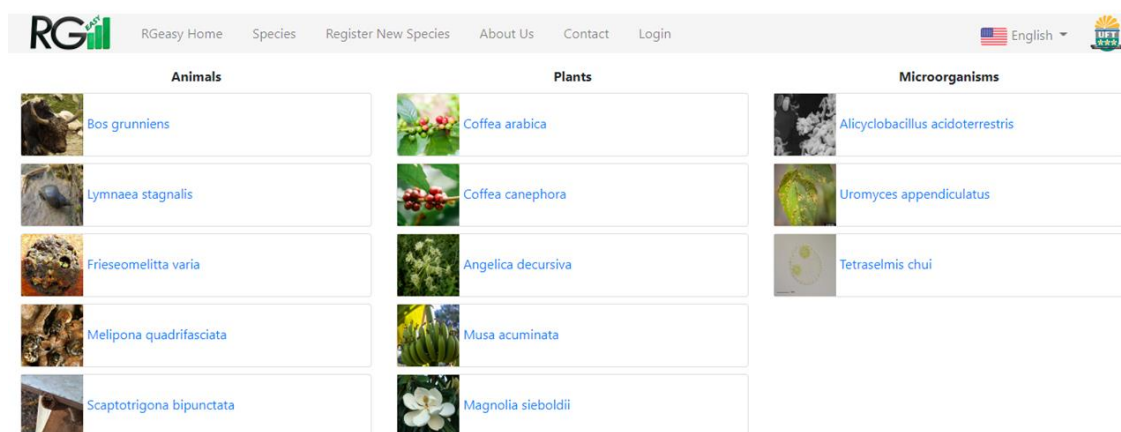
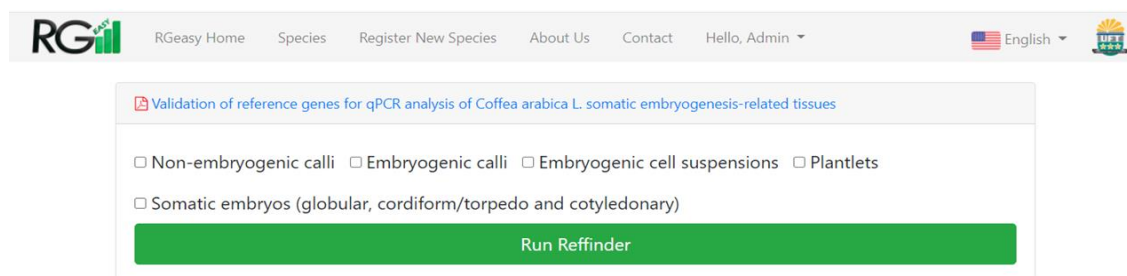


Figura 3- Categorias de espécies no RGeasy.

Para definir a combinação de tratamentos ou condições desejadas, o usuário deve selecionar as amostras de interesse, clicando no ícone ao seu lado (Figura 4). O resultado é exibido, instantaneamente, ao se clicar em “Run RefFinder”.



Validation of reference genes for qPCR analysis of *Coffea arabica* L. somatic embryogenesis-related tissues

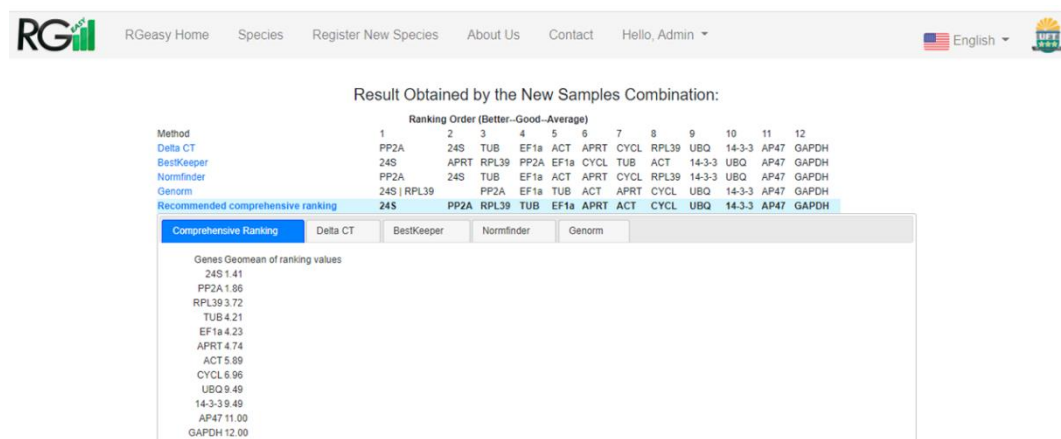
☐ Non-embryogenic calli
 ☐ Embryogenic calli
 ☐ Embryogenic cell suspensions
 ☐ Plantlets

☐ Somatic embryos (globular, cordiform/torpedo and cotyledonary)

Run Reffinder

Figura 4- Amostras analisadas no estudo intitulado “Validation of reference genes for qPCR analysis of *Coffea arabica* L. somatic embryogenesis-related tissues” de Freitas et al. (2017).

Como o RGeasy emprega a ferramenta do RefFinder, para a análise de estabilidade dos genes de referência, na página de resultados, é gerada uma tabela com o ranking dos genes, segundo os algoritmos: RefFinder, Delta CT, Bestkeeper, Normfinder e Genorm (Figura 5).



Result Obtained by the New Samples Combination:

| Method                                   | 1           | 2           | 3            | 4          | 5           | 6           | 7          | 8           | 9          | 10            | 11          | 12           |
|--|-------------|-------------|--------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|------------|---------------|-------------|--------------|
| Delta CT                                 | PP2A        | 24S         | TUB          | EF1a       | ACT         | APRT        | CYCL       | RPL39       | UBQ        | 14-3-3        | AP47        | GAPDH        |
| BestKeeper                               | 24S         | APRT        | RPL39        | PP2A       | EF1a        | CYCL        | TUB        | ACT         | 14-3-3     | UBQ           | AP47        | GAPDH        |
| Normfinder                               | PP2A        | 24S         | TUB          | EF1a       | ACT         | APRT        | CYCL       | RPL39       | 14-3-3     | UBQ           | AP47        | GAPDH        |
| Genorm                                   | 24S   RPL39 | PP2A        | EF1a         | TUB        | ACT         | APRT        | CYCL       | UBQ         | 14-3-3     | AP47          | GAPDH       |              |
| <b>Recommended comprehensive ranking</b> | <b>24S</b>  | <b>PP2A</b> | <b>RPL39</b> | <b>TUB</b> | <b>EF1a</b> | <b>APRT</b> | <b>ACT</b> | <b>CYCL</b> | <b>UBQ</b> | <b>14-3-3</b> | <b>AP47</b> | <b>GAPDH</b> |

Comprehensive Ranking   Delta CT   BestKeeper   Normfinder   Genorm

Genes Geomean of ranking values

24S 1.41  
 PP2A 1.86  
 RPL39 3.72  
 TUB 4.21  
 EF1a 4.23  
 APRT 4.74  
 ACT 5.89  
 CYCL 6.96  
 UBQ 9.49  
 14-3-3 9.49  
 AP47 11.00  
 GAPDH 12.00

Figura 5- Resultado gerado no RGeasy para diferentes amostras analisadas por Freitas et al. (2017).

Ainda, na página dos resultados, o RGeasy fornece um quadro com informações gerais, para cada um dos genes, de acordo com o ranking de estabilidade fornecido pelo RefFinder. Para cada gene, é disponibilizado o par de *primers*, o coeficiente de correlação ( $R^2$ ), eficiência ( $e^*$ ), número de acesso e o banco em que a sequência foi selecionada (Figura 6).

| Gene: UBQ  |      |                           | Gene: PSAB   |      |                           |
|--|------|---------------------------|--|------|---------------------------|
| Primer Sequence (Forward)                                    |      | Primer Sequence (Reverse) | Primer Sequence (Forward)                                    |      | Primer Sequence (Reverse) |
| TTTCCTGGCGTGGGTATTG  |      | CGGGTTTATCTCTCCAACGAAT    | TTTCCTGGCGTGGGTATTG  |      | CGGGTTTATCTCTCCAACGAAT    |
| R2   | e*   | Accession n               | R2   | e*   | Accession n               |
| 0.99276  | 95.0 | DV686961.1                | 0.9923   | 92.0 | GT648763.1                |
| Bank   |      |                           | Bank   |      |                           |
| GenBank National Center for Biotechnology Information (NCBI) |      |                           | GenBank National Center for Biotechnology Information (NCBI) |      |                           |

Figura 6- Representação das informações gerais disponibilizadas pelo RGeasy, para dois genes de referência, Ubiquitin (UBQ) e photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2 (PSAB), presentes no banco de dados do RGeasy.

Ao selecionar genes de referência, utilizando a ferramenta RGeasy, é imprescindível incluir, na seção Materiais e Métodos do artigo do usuário, a forma correta de citação do RGeasy, que é única, de acordo com a pesquisa que está sendo desenvolvida (Figura 7)

#### How to Cite

The RGeasy tool (citation soon) was used for the selection of reference genes through a new combination of treatments, obtained from the study developed by Freitas et al. (2017) and ranked by the RefFinder (XIE et al., 2012) tool.

#### References:

- [Reference Genes Easy](#)
- [RefFinder](#)
- [Validation of reference genes for qPCR analysis of Coffea arabica L. somatic embryogenesis-related tissues](#)

Figura 7- A forma correta de citar o RGeasy em cada estudo está presente no final da página de resultados.

## 3 Registro de Novas Espécies

### 3.1 Registro de uma única espécie

Para o registro de novas espécies, o usuário deve clicar em “Register New Species”, localizado na barra de navegação. Em seguida, o usuário deve adicionar uma imagem que melhor represente a espécie que está sendo cadastrada, informar a categoria de espécie (Animal, vegetal ou microrganismo) da nova espécie que está sendo adicionada e fornecer a fonte da imagem quando esta for obtida da internet (Figura 8).

The screenshot shows the RGeasy website interface. At the top, there is a navigation bar with links: RGeasy Home, Species, Register New Species, About Us, Contact, and Login. On the right, there is a language dropdown set to 'English' and a logo. Below the navigation bar, there is a 'Species Image' section with a 'Choose an Image' button. To the right, a question asks 'Which group of organisms does the new species belong to?' with radio buttons for 'Animals', 'Plants' (selected), and 'Microorganisms'. Below this, there is an 'Add Image Link:' field with a placeholder text 'Not Mandatory Field'.

Figura 8- Primeiros passos para o registro de uma nova espécie no banco de dados do RGeasy.

Posteriormente, deve-se adicionar o nome científico da espécie, assim como o nome do artigo, DOI, ano de publicação, autores, os valores de Cq's e os dados de cada gene de referência (sequencias de cada *primer*, o coeficiente de correlação ( $R^2$ ), a eficiência (e), o número de acesso e o banco de dados em que a sequência está depositada) (Figura 9).

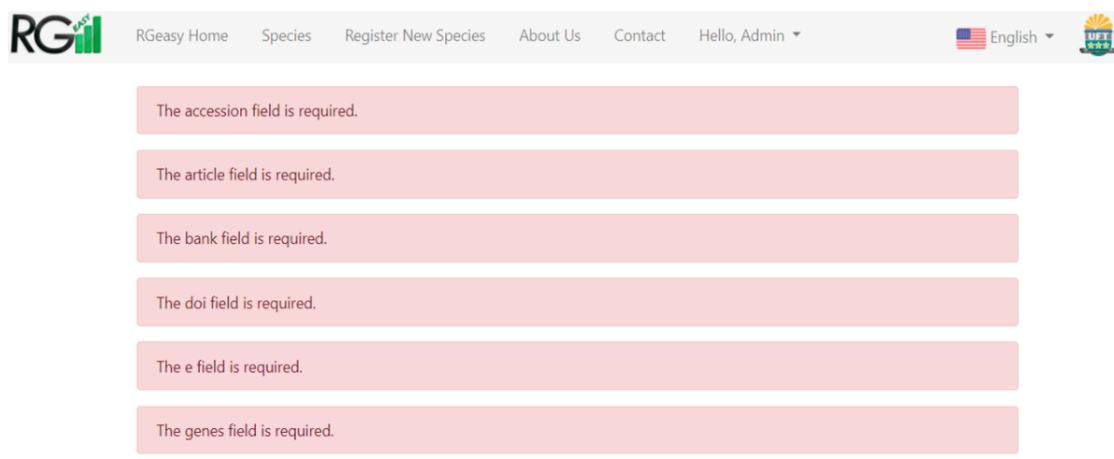
The screenshot shows the detailed registration form on the RGeasy website. It includes several sections: 'Add the Species Here:' with a dropdown menu showing 'Coffea arabica'; 'Article' with a text input field containing 'Validation of reference genes for qPCR analysis of Coffea arabica L. somatic embryogenesis-rela'; 'DOI' with a text input field containing 'https://doi.org/10.1007/s11240-016-1'; 'Year' with a text input field containing '2017'; 'Authors' with a text input field containing 'Natália Chagas Freitas, Horllys Gomes Barreto, Christiane Noronha Fernandes-Brum, Rafael Oliveira Moreira, Antonio Chalfun-Junior, Luciano Vilela Paiva'; 'Cq Values' with a table of values; and 'Reference Genes Information' with a table of gene data. A green 'Create' button is at the bottom.

| Samples               | 24S   | ACT   | GAPDH | CYCL  | EF1a  | TUB   | PP2A  | AP47  | RPL39 | APRT  | UBQ   | 14-3-3 |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Non-embryogenic calli | 23.81 | 19.41 | 17.22 | 19.15 | 18.30 | 23.85 | 24.37 | 24.18 | 19.93 | 23.23 | 25.37 | 19.68  |
| Non-embryogenic calli | 23.78 | 19.42 | 17.22 | 19.16 | 18.28 | 23.91 | 24.40 | 24.20 | 19.91 | 23.26 | 25.37 | 19.74  |
| Non-embryogenic calli | 23.80 | 19.42 | 17.22 | 19.15 | 18.29 | 23.88 | 24.38 | 24.19 | 19.92 | 23.25 | 25.37 | 19.71  |

| Gene  | Primer-Forward          | Primer-Reverse          | R2    | e     | Accession   | Bank    |
|-------|-------------------------|-------------------------|-------|-------|-------------|---------|
| 24S   | GACCAATCGTCTTCTTCCGAAA  | TCAACTCAGCCTTGGAACATTAG | 0.984 | 100.0 | GT730897.1a | GenBank |
| ACT   | GCCAGATGGACAAGTGATTACCA | CAGCAGCTTCCATTCTATGATAG | 0.969 | 100.0 | GT000704.1a | GenBank |
| GAPDH | GGGAAGAGCTGCTTCAATTAACA | CCATTGAGGGCTGGAAGAAC    | 0.987 | 95.0  | GW488886.1a | GenBank |

Figura 9- Informações necessárias para o registro de uma nova espécie no banco de dados do RGeasy.

Ao preencher cada campo, não use "Enter", pois a ferramenta entenderá que todos os campos foram preenchidos. Porém, como nem todos os campos estarão preenchidos, resultará em uma mensagem de erro como indicado na figura abaixo (Figura 10).



The accession field is required.

The article field is required.

The bank field is required.

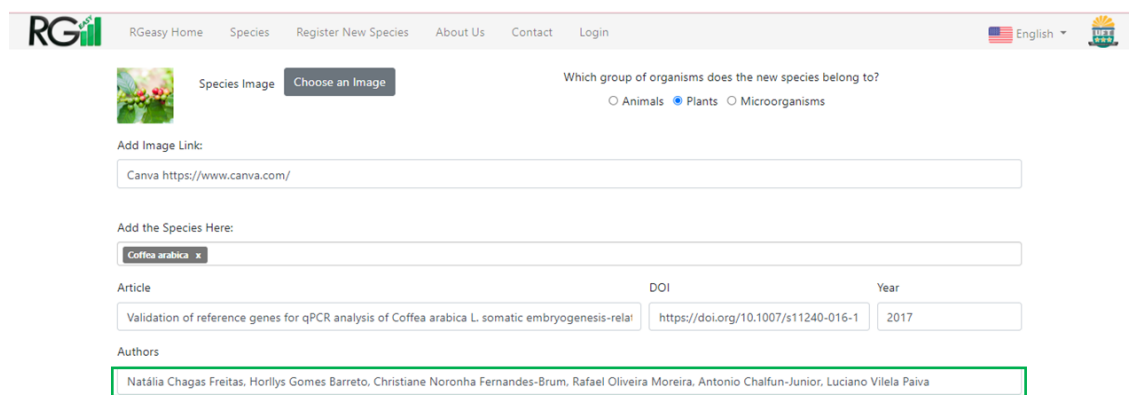
The doi field is required.

The e field is required.

The genes field is required.

Figura 10- Mensagem de erro gerado em razão dos campos em branco durante o registro de uma nova espécie no banco de dados do RGeasy.

O nome de todos os autores do artigo deve ser inserido no campo “Authors” e deve ser separado exclusivamente por vírgula, não podendo ser empregado pontuações como “; : .” ou o sinal “&” (Figura 11).



RGGeasy Home Species Register New Species About Us Contact Login

Species Image Choose an Image

Which group of organisms does the new species belong to?

☐ Animals ☒ Plants ☐ Microorganisms

Add Image Link:

Canva <https://www.canva.com/>

Add the Species Here:

Coffea arabica x

Article DOI Year

Validation of reference genes for qPCR analysis of Coffea arabica L. somatic embryogenesis-relat <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1> 2017

Authors

Natália Chagas Freitas, Horllys Gomes Barreto, Christiane Noronha Fernandes-Brum, Rafael Oliveira Moreira, Antonio Chalfun-Junior, Luciano Vilela Paiva

Figura 11- Preenchimento do campo “Authors”, durante o registro de uma nova espécie, no banco de dados do RGeasy.

Para o preenchimento dos dados de Cq's assim como as informações dos genes de referência (Figura 9), solicitamos que os usuários organizem previamente as informações em duas tabelas exatamente como exemplificado nas figuras 12 e 13. Feito isso, as informações devem ser coladas em cada um dos campos correspondentes como indicado na figura 9.



|    | A                     | B     | C     | D     | E     | F     | G     | H     | I     | J     | K     | L     | M      |
|----|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| 1  | Samples               | 24S   | ACT   | GAPDH | CYCL  | EF1a  | TUB   | PP2A  | AP47  | RPL39 | APRT  | UBQ   | 14-3-3 |
| 2  | Non-embryogenic calli | 23.81 | 19.41 | 17.22 | 19.15 | 18.30 | 23.85 | 24.37 | 24.18 | 19.93 | 23.23 | 25.37 | 19.68  |
| 3  | Non-embryogenic calli | 23.78 | 19.42 | 17.22 | 19.16 | 18.28 | 23.91 | 24.40 | 24.20 | 19.91 | 23.26 | 25.37 | 19.74  |
| 4  | Non-embryogenic calli | 23.80 | 19.42 | 17.22 | 19.15 | 18.29 | 23.88 | 24.38 | 24.19 | 19.92 | 23.25 | 25.37 | 19.71  |
| 5  | Non-embryogenic calli | 23.54 | 19.41 | 17.32 | 19.20 | 18.29 | 23.59 | 24.33 | 24.05 | 19.75 | 22.86 | 25.37 | 19.56  |
| 6  | Non-embryogenic calli | 23.50 | 19.50 | 17.28 | 19.18 | 18.29 | 23.73 | 24.43 | 24.10 | 19.79 | 22.79 | 25.33 | 19.50  |
| 7  | Non-embryogenic calli | 23.52 | 19.46 | 17.30 | 19.19 | 18.29 | 23.66 | 24.38 | 24.08 | 19.77 | 22.83 | 25.35 | 19.53  |
| 8  | Non-embryogenic calli | 23.65 | 19.47 | 17.34 | 19.08 | 18.12 | 23.91 | 24.54 | 24.38 | 19.88 | 22.98 | 25.39 | 19.90  |
| 9  | Non-embryogenic calli | 23.67 | 19.47 | 17.36 | 19.11 | 18.12 | 23.94 | 24.56 | 24.40 | 19.88 | 22.91 | 25.39 | 19.91  |
| 10 | Non-embryogenic calli | 23.66 | 19.47 | 17.35 | 19.09 | 18.12 | 23.92 | 24.55 | 24.39 | 19.88 | 22.94 | 25.39 | 19.91  |
| 11 | Embryogenic calli     | 23.40 | 20.63 | 18.42 | 18.24 | 17.93 | 22.76 | 23.81 | 24.44 | 19.76 | 23.57 | 23.54 | 19.57  |
| 12 | Embryogenic calli     | 23.39 | 20.63 | 18.44 | 18.28 | 17.91 | 22.69 | 23.81 | 24.47 | 19.74 | 23.80 | 23.48 | 19.67  |
| 13 | Embryogenic calli     | 23.40 | 20.63 | 18.43 | 18.26 | 17.92 | 22.72 | 23.81 | 24.45 | 19.75 | 23.69 | 23.51 | 19.62  |
| 14 | Embryogenic calli     | 23.22 | 20.65 | 19.25 | 18.90 | 18.80 | 22.91 | 23.79 | 24.43 | 19.61 | 23.70 | 23.29 | 19.05  |
| 15 | Embryogenic calli     | 23.22 | 20.63 | 19.25 | 18.76 | 18.73 | 22.91 | 23.87 | 24.41 | 19.67 | 23.70 | 23.27 | 19.06  |
| 16 | Embryogenic calli     | 23.22 | 20.64 | 19.25 | 18.83 | 18.84 | 22.91 | 23.83 | 24.42 | 19.64 | 23.70 | 23.28 | 19.06  |
| 17 | Embryogenic calli     | 23.50 | 20.96 | 18.76 | 18.70 | 17.67 | 23.16 | 24.69 | 25.08 | 19.75 | 24.56 | 23.78 | 19.78  |
| 18 | Embryogenic calli     | 23.54 | 20.96 | 18.74 | 18.65 | 17.69 | 23.17 | 24.68 | 25.21 | 19.70 | 24.60 | 23.80 | 19.78  |
| 19 | Embryogenic calli     | 23.52 | 20.96 | 18.75 | 18.67 | 17.68 | 23.16 | 24.68 | 25.29 | 19.66 | 24.58 | 23.79 | 19.78  |

Figura 12- Os valores de Cq devem ser organizados em colunas, uma para cada gene de referência, e o tipo de amostra deve ser descrito nas linhas da planilha. A planilha deve ser colada no campo 'Cq data' ao registrar uma nova espécie.

|    | A      | B                        | C                        | D     | E     | F            | G                                   |
|----|--------|--------------------------|--------------------------|-------|-------|--------------|-------------------------------------|
| 1  | Gene   | Primer-Forward           | Primer-Reverse           | R2    | e     | Accession    | Bank                                |
| 2  | 24S    | GACCAATCGTCTCTTCCAGAAA   | TCAACTCAGCCTTGGAAACATTAG | 0.984 | 100.0 | GT730897.1a  | GenBank                             |
| 3  | ACT    | GCCAGATGGACAAGTGATTACCA  | CAGCAGCTTCCATTCTATGATAG  | 0.969 | 100.0 | GT000704.1a  | GenBank                             |
| 4  | GAPDH  | GGGAAGAGCTGCTTCATTAAACA  | CCATTGAGGGCTGGAAGAAC     | 0.987 | 95.0  | GW488886.1a  | GenBank                             |
| 5  | CYCL   | TGGTCCAGGGATTTTGCCAT     | CGGTCTTGTGGTGCAGAT       | 0.997 | 96.0  | GT007167.1a  | GenBank                             |
| 6  | EF1a   | GGTGGTTTTGAAGCTGGTATTCT  | TGTTGCAGCAGCATCATTT      | 0.997 | 92.0  | GR996930.1a  | GenBank                             |
| 7  | TUB    | TCGGGCTGTCTCATGGAT       | TTGTCGGGCTGAAGATCTG      | 0.995 | 90.0  | GT707405.1a  | GenBank                             |
| 8  | PP2A   | ACCTATGGGTGAAATGAAGATGGA | AGGCGGCGAGATGAATCTTT     | 0.973 | 97.0  | GT005097.1a  | GenBank                             |
| 9  | AP47   | GGGTACGCTCACCATTTCATC    | AGCCAACAGCACCAGTAACCTTG  | 0.947 | 97.0  | DV690764.1a  | GenBank                             |
| 10 | RPL39  | GCGAAGAAGCAGAGGCAGAA     | TTGGCATTGTAGCGGATGGT     | 0.991 | 87.0  | GT720707.1a  | GenBank                             |
| 11 | APRT   | TGGAGAAGCGGCTCTGGTAGT    | ACGCGCTCAAGTAGCGTGAT     | 0.992 | 92.0  | GR996015.1a  | GenBank                             |
| 12 | UBQ    | AATCCGTCCCCGATGTT        | CCAGTGCATCTGTTGTCTCA     | 0.999 | 99.0  | Cc05_g12790b | Sol Genomics Network (SGN) database |
| 13 | 14.3.3 | AGCTCAGCAAGATATGTATGGAA  | TGGTAGTCACCTTCATTTCAGA   | 0.955 | 80.0  | SGNU356404b  | Sol Genomics Network (SGN) database |
| 14 |        |                          |                          |       |       |              |                                     |

Figura 13- As informações relacionadas a cada gene de referência, incluindo sequências de primers, coeficiente de correlação (R2), eficiência de amplificação (e), número de acesso e banco de dados onde a sequência está depositada, devem ser organizadas em colunas, e cada gene de referência em linhas da planilha, que é então colado no campo 'Genes Data' ao registrar uma nova espécie ao registrar uma nova espécie.

Após a adição das informações dos dados de Cq's e dos genes de referência, basta clicar em "Create", para finalizar o registro da espécie.

### 3.2 Registro de mais de uma espécie

Pesquisadores que realizam estudos que analisam a estabilidade de genes candidatos de referência, para duas ou mais espécies, podem fazer o registro das diferentes espécies por meio de um único processo de registro (Figura 14). Contudo, isso só é possível se o mesmo grupo de genes candidatos a genes de referência estiver sendo analisado para ambas as espécies. Caso contrário, as espécies devem ser registradas, separadamente e, portanto o artigo terá que ser registrado mais de uma vez.

**A**

RG Home Species **Register New Species** About Us Contact Hello, Admin

Species Image  Which group of organisms does the new species belong to?  
☐ Animals ☒ Plants ☐ Microorganisms

Add Image Link:  
 Canva <https://www.canva.com/>

Add the Species Here:

Article DOI Year  
 10.1007/s11240-016-1147-6 2015

Authors

**B**

RG Home Species **Register New Species** About Us Contact Hello, Admin

Species Image  Which group of organisms does the new species belong to?  
☐ Animals ☒ Plants ☐ Microorganisms

Add Image Link:  
 Canva <https://www.canva.com/>

Add the Species Here:

Article DOI Year  
 10.1007/s11240-016-1147-6 2015

Authors

Figura 14- Processo de registro de duas ou mais espécies. O nome da segunda espécie deve ser acrescentado, logo após o nome da primeira espécie, sendo esses nomes separados por vírgula. Registro de uma espécie (A). Registro de duas ou mais espécies (B).

Durante o registro dos valores de Cq's, é fundamental identificar cada amostra com o nome da espécie a que se refere (Figura 15), para que o RGeasy possa diferenciar corretamente cada uma. Caso contrário, a ferramenta pode reconhecer duas ou mais amostras como apenas uma amostra. As etapas posteriores do registro de duas ou mais espécies são semelhantes às do registro de uma única espécie.

|    | A                 | B      | C     | D     | E      | F     | G     | H     | I     |
|----|-------------------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|
| 1  | Samples           | 14-3-3 | RPL7  | PSAB  | ACTINA | DMXT  | GAPDH | ADH2  | UBQ   |
| 2  | C. canephora Root | 18.83  | 22.35 | 18.95 | 22.28  | 22.09 | 21.16 | 22.49 | 19.22 |
| 3  | C. canephora Root | 18.79  | 22.26 | 19.07 | 22.20  | 21.99 | 21.18 | 22.35 | 19.24 |
| 4  | C. canephora Root | 18.80  | 22.37 | 18.99 | 22.29  | 22.23 | 21.29 | 22.56 | 19.06 |
| 5  | C. canephora Root | 27.06  | 31.08 | 26.96 | 28.89  | 28.29 | 26.04 | 29.10 | 27.45 |
| 6  | C. canephora Root | 26.97  | 32.27 | 27.25 | 28.81  | 28.43 | 26.29 | 28.77 | 27.39 |
| 7  | C. canephora Root | 26.76  | 30.59 | 26.88 | 28.96  | 28.56 | 26.11 | 29.05 | 27.33 |
| 8  | C. canephora Root | 18.35  | 22.30 | 20.11 | 22.19  | 23.44 | 20.30 | 22.41 | 20.21 |
| 9  | C. canephora Root | 18.28  | 22.30 | 20.18 | 22.16  | 23.56 | 20.35 | 22.51 | 20.36 |
| 10 | C. canephora Root | 18.30  | 22.26 | 20.37 | 22.21  | 23.49 | 20.28 | 22.49 | 20.18 |
| 11 | C. arabica Root   | 21.80  | 19.87 | 20.52 | 18.77  | 20.42 | 25.71 | 23.70 | 23.93 |
| 12 | C. arabica Root   | 21.78  | 19.85 | 20.42 | 18.79  | 20.50 | 25.81 | 23.84 | 23.75 |
| 13 | C. arabica Root   | 21.78  | 20.15 | 20.48 | 18.93  | 20.28 | 25.89 | 23.75 | 23.79 |
| 14 | C. arabica Root   | 23.48  | 23.76 | 23.73 | 21.68  | 22.13 | 30.54 | 26.20 | 26.08 |
| 15 | C. arabica Root   | 23.42  | 23.94 | 23.78 | 21.65  | 22.22 | 30.62 | 26.15 | 26.08 |
| 16 | C. arabica Root   | 23.38  | 23.38 | 23.96 | 21.82  | 22.40 | 30.71 | 26.34 | 26.04 |
| 17 | C. arabica Root   | 21.67  | 20.18 | 20.57 | 18.66  | 20.02 | 27.67 | 23.59 | 24.14 |
| 18 | C. arabica Root   | 21.68  | 20.06 | 20.63 | 18.59  | 19.98 | 27.36 | 23.66 | 24.06 |
| 19 | C. arabica Root   | 21.77  | 20.29 | 20.63 | 18.62  | 19.97 | 27.43 | 23.66 | 24.11 |

Figura 15- Conforme destacado em verde, quando duas ou mais espécies estiverem presentes, cada amostra da planilha deve ser nomeada corretamente com o nome da espécie seguido do tipo de amostra, para que o RGeasy possa diferenciar corretamente cada amostra. Amostras analisadas no estudo intitulado “A panel of the most suitable reference genes for RT-qPCR expression studies of coffee: screening their stability under different conditions” de Fernandes-Brum et al. (2017).

## Referências

Fernandes-Brum,C.N., de Oliveira Garcia,B., Moreira,R.O., Ságio,S.A., Barreto,H.G., Lima,A.A., Freitas,N.C., de Lima,R.R., de Carvalho,C.H.S. and Chalfun-Júnior,A. (2017) A panel of the most suitable reference genes for RT-qPCR expression studies of coffee: screening their stability under different conditions. *Tree Genet Genomes*, **13**, 1–13.

Freitas,N.C., Barreto,H.G., Fernandes-Brum,C.N., Moreira,R.O., Chalfun-Junior,A. and Paiva,L.V. (2017) Validation of reference genes for qPCR analysis of *Coffea arabica* L. somatic embryogenesis-related tissues. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, **128**, 663–678.

Xie,F., Xiao,P., Chen,D., Xu,L. and Zhang,B. (2012) miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol Biol*, **80**, 75–84.