

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE AGRONOMIA**

**JÉSSICA VERONICA NASILOWSKI**

**TEMPO MÉDIO DE BROTAÇÃO E COMPARAÇÃO ENTRE PROTOCOLOS PARA  
EXTRAÇÃO DE RNA EM LENHO DE MACIEIRA**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**PATO BRANCO**

**2021**

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE AGRONOMIA**

**JÉSSICA VERONICA NASILOWSKI**

**TEMPO MÉDIO DE BROTAÇÃO E COMPARAÇÃO ENTRE  
PROTOCOLOS PARA EXTRAÇÃO DE RNA EM LENHO DE  
MACIEIRA**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**PATO BRANCO**

**2021**

JÉSSICA VERONICA NASILOWSKI

**TEMPO MÉDIO DE BROTAÇÃO E COMPARAÇÃO ENTRE  
PROTOCOLOS PARA EXTRAÇÃO DE RNA EM LENHO DE  
MACIEIRA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus* Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Prof. Dr. Idemir Citadin

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Taciane Finatto

PATO BRANCO

2021

**Nasilowski, Jéssica Veronica**

**Tempo médio de brotação e comparação entre protocolos para extração de RNA em lenho de macieira / Jéssica Veronica Nasilowski. Pato Branco. UTFPR, 2021**

**40 f. : il. ; 30 cm**

**Orientador: Prof. Dr. Idemir Citadin**

**Coorientador: Prof. Dr. Taciane Finatto**

**Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curso de Agronomia. Pato Branco, 2018.**

**Bibliografia: f. 31 – 34**

**1. Dormência. 2. Macieira. 3. Brotação. I. Citadin, Idemir,II. Finatto, Taciane, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curso de Agronomia. IV. Título.**

**CDD: 630**



## **TERMO DE APROVAÇÃO**

### **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO - TCC**

#### **Tempo médio de brotação e comparação entre protocolos para extração de RNA em lenho de macieira**

Por

Jéssica Veronica Nasilowski

Monografia defendida em sessão pública às 15 horas do dia 04 de maio de 2021 como requisito parcial, para conclusão do Curso de Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus* Pato Branco. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos Membros abaixo assinados. Após deliberação e conferidas, bem como achadas conforme, as alterações indicadas pela Banca Examinadora, o Trabalho de Conclusão de Curso, em sua forma final, pela Coordenação do Curso de Agronomia foi considerado APROVADO.

Banca examinadora:

M.Sc. Rafael Henrique Pertille - PPGAG-PB UTFPR - Doutorando

Prof. Dr. Idemir Citadin - UTFPR *Campus* Pato Branco- Orientador

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Taciane Finatto - UTFPR *Campus* Pato Branco - Coorientadora

Prof. Dr. Jorge Jamhour - Professor responsável TCC 2

A "Ata de Defesa" e o decorrente "Termo de Aprovação" encontram-se assinados e devidamente depositados no SEI-UTFPR da Coordenação do Curso de Agronomia da UTFPR *Campus* Pato Branco, após a entrega da versão corrigida do trabalho, conforme Norma aprovada pelo Colegiado de Curso.

Dedico este trabalho aos meus pais, Jorge Nasilowski e Rozeli Teresinha Nasilowski, meus maiores incentivadores e exemplos de vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, pelo apoio, amor e incentivo.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Idemir Citadin e Prof. Dr. Taciane Finatto pelos ensinamentos repassados a mim.

Ao senhor Geraldo Lovo por permitir a execução desse trabalho em sua propriedade.

Aos colegas Debora Gobatto, Alana Madureira e Rafael Pertille que auxiliaram nas atividades.

Ao CNPq pela bolsa de iniciação científica (PIBIC/CNPq – **08/2015 a 07/2016**) e à UTFPR *Campus* Pato Branco pela oportunidade de formação.

Lembre-se, desistir não é uma opção.



## RESUMO

NASILOWSKI, Jéssica Veronica. Tempo médio de brotação e comparação entre protocolos para extração de RNA em lenho de macieira. 40 f. TCC (Curso de Agronomia), Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Pato Branco, 2021.

A cultura da macieira é de grande importância no cenário mundial de produção de frutíferas de clima temperado e sua produtividade está diretamente ligada ao processo de dormência. Objetiva-se no presente trabalho avaliar o tempo médio de brotação em três cultivares de macieira de baixa e média necessidade de frio. Além de testar a eficiência de diferentes protocolos de extração de RNA em lenho. O material vegetal utilizado foi coletado em um pomar comercial situado no município de Palmas-PR. Foram estudadas as cultivares 'Eva', 'Fuji Suprema' e 'Galaxy'. A avaliação da dinâmica da dormência foi feita a partir do teste de uma só gema, quantificando o tempo médio de brotação (TMB). A extração de RNA se deu pelos métodos descritos por Salzman (1999), Zeng e Yang (2002), Quick Zol® e PureLink™ Plant RNA Reagent. Conclui-se que plantas submetidas a invernos amenos não apresentam um pico de TMB bem definido, não entrando em um estado de endodormência profunda, e que diante dos inúmeros protocolos de extração de ácidos nucleicos, deve-se testar eficiência, tempo, custo e resíduo.

**Palavras-chave:** Dormência. Macieira. Brotação.

## ABSTRACT

NASILOWSKI, Jéssica Veronica. Average time of budburst of three apple trees cultivars and comparison between protocols for RNA extraction in wood. 40 f. TCC (Course of Agronomy) - Federal University of Technology – Paraná (UTFPR). Pato Branco, 2021.

Apple culture is of great importance in the world scenario of temperate fruit production and its productivity is directly linked to the dormancy process. The present study aims to evaluate the mean time of budburst of three apple trees cultivars of low and medium chilling requirements and to test the efficiency of different protocols for RNA extraction in wood. Plant material were collected in a commercial orchard in Palmas, Southwest of Paraná. Cultivars used were “Eva”, “Fuji Suprema” and “Galaxy”. The evaluation of dormancy dynamics was done by single-node cutting methodology through the quantification of Mean Time of Budburst (MTB). The RNA extraction was done by the methods described by Salzman (1999), Zeng and Yang (2002), Quick Zol® and PureLink™ Plant RNA Reagent. The plants exposed to mild winters did not have a well-defined peak of MTB, and in face of the numerous protocols for nucleic acid extraction, efficiency, time, cost and residue should be tested.

**Keywords:** Dormancy. Apple tree. Leafing

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1--Temperaturas diárias em °C (A) e número de horas abaixo de 7,2 °C (B), registrados pela estação meteorológica do IAPAR, em Palmas-PR, no ano de 2017. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2020..... 26
- Figura 2--Tempo médio de brotação (A) e percentagem de brotação (B) em ramos de macieira da cultivar Fuji, coletados em um pomar comercial na cidade de Palmas, PR. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2020..... 27
- Figura 3--Tempo médio de brotação (A) e percentagem de brotação (B) em ramos de macieira da cultivar Gala, coletados em um pomar comercial na cidade de Palmas, PR. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2020..... 27
- Figura 4--Tempo médio de brotação (A) e percentagem de brotação (B) em ramos de macieira da cultivar Eva, coletados em um pomar comercial na cidade de Palmas, PR. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2020..... 28
- Figura 5--Eletroforese em gel de agarose 1% do RNA extraído com diferentes protocolos. A - Marcador de peso molecular. B – Quick-Zol®. C – Zeng e Yang (2002). D – PureLink™ Plant RNA Reagent®. E – Salzman *et al* (1999) adaptado. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2020..... 29

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tempo gasto, em minutos, e custo dos reagentes utilizados em cada amostra nas principais etapas dos protocolos para extração de RNA em lenho de macieira (R\$)\*.....30

## LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

|       |   |
|-------|---|
| DNA   | Ácido desoxirribonucleico                               |
| FAO   | Food and Agriculture Organization of the United Nations |
| IBGE  | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística         |
| PR    | Unidade de federação, Paraná                            |
| RNA   | Ácido ribonucleico                                      |
| TMB   | Tempo médio de brotação                                 |
| HF    | Hora de frio  |
| IAPAR | Instituto Agronômico do Paraná                          |
| Cfb   | Clima temperado com verão ameno                         |
| PV    | Ponta verde   |
| pH    | Potencial hidrogeniônico                                |

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>13</b> |
| <b>2 OBJETIVOS.....</b>  | <b>15</b> |
| 2.1 GERAL.....   | 15        |
| 2.2 ESPECÍFICOS.....   | 15        |
| <b>3 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>  | <b>16</b> |
| 3.1 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA, ORIGEM, HISTÓRIA E IMPORTÂNCIA<br>ECONÔMICA.....       | 16        |
| 3.2 CONDIÇÕES CLIMÁTICAS PARA A MACIEIRA E FISIOLOGIA DA<br>DORMÊNCIA.....         | 16        |
| 3.3 Tempo médio de brotação.....   | 18        |
| 3.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA NA AGRICULTURA.....                                | 18        |
| 3.4 CULTIVARES ESTUDADAS.....  | 19        |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>   | <b>21</b> |
| 4.1 DADOS CLIMÁTICOS.....  | 21        |
| 4.2 TESTE DE UMA SÓ GEMA (RAGEAU, 1978).....                                       | 21        |
| 4.3 extração de RNA.....   | 22        |
| 4.3.1 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL PELO MÉTODOS DE (SALZMAN <i>et al.</i> , 1999).....    | 22        |
| 4.3.2 EXTRAÇÃO DE RNA pelo método (ZENG; YANG, 2002).....                          | 23        |
| 4.3.3 EXTRAÇÃO DE RNA pelo método com quick – zol®.....                            | 23        |
| 4.3.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL com Pure Link Plant RNA Reagent (Invitrogen®)<br>..... | 24        |
| 4.3.5 Eletroforese do RNA.....   | 24        |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>  | <b>26</b> |
| 5.3 ESTIMATIVA DE CUSTO E DE TEMPO.....  | 29        |
| <b>6 CONCLUSÕES.....</b>   | <b>31</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>32</b> |
| <b>PROCOLO MODIFICADO DE EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL (SALZMAN, 1999)<br/>.....</b>       | <b>37</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A produção mundial de frutas se caracteriza pela grande diversidade de espécies cultivadas, e constitui-se em grande parte por frutas de clima temperado. A cultura da macieira (*Malus domestica* Bork.) é de grande importância no cenário mundial de produção de frutíferas de clima temperado. Segundo a (FAOSTAT, [s.d.]) no ano de 2018 a produção mundial de maçã foi de cerca de 86 milhões de toneladas, sendo a produção brasileira de cerca 1,1 milhão de toneladas. No Brasil, a principal área produtora se localiza na região sul, com cerca de 99% da produção nacional (IBGE, 2016). Nos três estados produtores da região Sul, busca-se a eficiência da produção de maçã, contribuindo para o aumento da quantidade produzida, o que permitiu ao país passar de importador de maçãs para potencial exportador da fruta (RECH; CARIO; AUGUSTO, 2014). Estes avanços se devem a importantes tecnologias que foram introduzidas ao longo dos anos, o que permitiu um aumento de qualidade e produtividade da cultura (PETRI *et al.*, 2011).

A produtividade da macieira está diretamente ligada ao processo de dormência, dado que um ciclo de dormência bem ajustado é fundamental para o alcance integral do seu potencial genético (FALAVIGNA *et al.*, 2015). O estudo da fisiologia da dormência de gemas é fundamental para o sucesso do manejo da superação da dormência, técnica necessária para a exploração racional de espécies de clima temperado no Brasil (CARVALHO; ZANETTE, 2004). A metodologia de estacas de uma só gema (RAGEAU, 1978) permite estudar a dinâmica da dormência desde a entrada até a retomada do crescimento ativo e separar os componentes de para, endo e ecodormência (LANG *et al.*, 1985), expressando os resultados em tempo médio de brotação das gemas estudadas.

Para os programas de melhoramento de frutíferas, os marcadores moleculares representam uma ferramenta adicional, pois além de permitir a conservação do germoplasma possibilita a identificação de materiais genéticos com características desejáveis em plantas cultivadas (FERRÃO *et al.*, 2016). Para a realização da maioria das metodologias de biologia molecular, o primeiro passo é a extração dos ácidos nucleicos (DNA e RNA). Para tal, é imprescindível a obtenção

de um material com qualidade e em quantidades necessárias para o estudo da expressão gênica em plantas cultivadas.

Apesar dos avanços significativos, os mecanismos genéticos de indução e liberação de dormência em macieiras não são totalmente compreendidos, logo o estudo genético da dormência macieira é um processo complexo e a identificação dos genes controladores é um grande desafio.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar a tempo médio de brotação em três cultivares de macieira de baixa e média necessidade de frio e testar a eficiência de diferentes protocolos de extração de RNA em lenho.

### 2.2 ESPECÍFICOS

Avaliar a dinâmica da dormência pelo teste de uma só gema e quantificar o Tempo Médio de Brotação (TMB);

Comparar a eficiência de quatro diferentes protocolos de extração de RNA de lenho;

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA, ORIGEM, HISTÓRIA E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Originária da Ásia, a macieira cultivada comercialmente (*Malus domestica* Borkh.) pertencente à família Rosaceae e subfamília Pomoideae. A espécie *Malus domestica* é a frutífera de clima temperado que mais tem sido cultivada na Europa e na Ásia desde a antiguidade (SRIVASTAVA *et al.*, 2013).

A cultura da macieira no Brasil iniciou seu desenvolvimento comercial na década de 70, sendo que, até esta data, foram poucos os plantios comerciais (PETRI *et al.*, 2011). O aumento das áreas plantadas ocorreu devido à iniciativa de produtores pioneiros, amparados por incentivos fiscais que permitiam aplicar parte do imposto de renda na implantação de pomares. Paralelamente, o governo passou a estimular projetos para o desenvolvimento da cultura (GOMES; NETO, 2015). Segundo (PETRI *et al.*, 2011), após a visita de um dos maiores viveiristas da Europa Sr. George Delbard, houve a importação de cerca de 100 mil mudas de diferentes fruteiras de clima temperado, sendo a macieira a de maior destaque.

Segundo a FAO, no ano de 2018 foram 33.029 hectares colhidos da cultura, totalizando 1.195.007 toneladas de frutos colhidos, com a criação de cerca de 195 mil empregos diretos e indiretos (KIRST, 2016).

#### 3.2 CONDIÇÕES CLIMÁTICAS PARA A MACIEIRA E FISIOLOGIA DA DORMÊNCIA

A macieira, frutífera de clima temperado caracteriza-se pela queda das folhas no final do ciclo (outono) e, conseqüente, entrada em dormência no inverno, com redução de suas atividades metabólicas (FRANCESCATTO, 2014). Temperaturas baixas e contínuas no inverno são indispensáveis para que as plantas iniciem um novo ciclo vegetativo, com brotação e floração normais (CARDOSO *et al.*, 2012). Para a fase vegetativa, as condições térmicas de primavera e verão

também influenciam no desenvolvimento da macieira. Para se iniciar um novo ciclo vegetativo, em condições naturais, é necessário que esta seja exposta a um período de baixas temperaturas durante o inverno, sendo que este período é variável em função da cultivar (PETRI *et al.*, 1996). Esta exigência de horas de frio (HF) acumuladas pode variar de 200 a 1.400 horas dependendo da cultivar.

A não ocorrência de frio em qualidade e quantidade suficientes e, conseqüentemente, a não eliminação da dormência, altera totalmente o comportamento de uma espécie, ocasionando um desenvolvimento irregular da cultura (SCARIOTTO, 2011). Embora seja possível efetuar a superação da dormência com substâncias químicas, os resultados finais de crescimento, produção e qualidade são, geralmente, inferiores aos obtidos com cultivares adaptadas (WAGNER JÚNIOR *et al.*, 2010).

Dormência é uma fase de desenvolvimento de ocorrência anual, resultante da adaptação das plantas às condições ambientais (HAWERROTH *et al.*, 2010). Esse fenômeno pode ocorrer basicamente em todos os órgãos que possuem meristemas (EREZ, 2000). Segundo (PETRI *et al.*, 1996), esse período compreende desde a paralisação do crescimento, no outono, até o início da brotação na primavera seguinte. A entrada e saída da dormência são influenciadas por fatores genéticos e ambientais, como cultivar, porta-enxerto, temperatura, luz, época de ocorrência de frio e precipitação pluvial, além dos reguladores de crescimento (ácido abscísico, auxinas e citocininas) (CARDOSO, 2011).

A dormência pode ser dividida em três estádios fisiológicos: paradormência, endodormência e ecodormência (LANG *et al.*, 1985).

Na paradormência, o crescimento de gemas axilares não pode ser visível, pois a inibição da gema é regulada por fatores fisiológicos e externos a estrutura afetada, causando a inativação do meristema floral ou vegetativo (LANG *et al.*, 1985). A paradormência ocorre quando as plantas estão metabolicamente mais ativas, ou seja, nas fases de crescimento e produção (ANZANELLO, 2012)

A endodormência ocorre durante a estação do inverno, quando há a paralisação no desenvolvimento da gema como forma de sobrevivência, mas internamente ocorrem processos fisiológicos e bioquímicos (LEITE, 2010). Para Faust *et al.*, (1997) a endodormência pode ser dividida em d-endodormência

(dormência profunda) e a s-endodormência (dormência superficial). A d-endodormência ocorre a partir da paradormência, com possível sobreposição, até o pico de dormência. Nesse período os agentes químicos de indução de brotação/floração não possuem efeito de complementação ao frio. A s-endodormência é o período após o pico de dormência, em que o uso de agentes químicos pode compensar o restante da necessidade de frio, antecipando e homogeneizando a retomada de crescimento (SACHET, 2018)

A superação da endodormência acontece somente após as necessidades de frio ser superada. A ecodormência é regulada por fatores ambientais, apesar das gemas possuírem completa capacidade de brotação, permanecem em repouso até que a temperatura se torne mais elevada, permitindo que estabeleça a fase vegetativa da planta (LANG *et al.*, 1987)

### 3.3 TEMPO MÉDIO DE BROTAÇÃO

Dentre os métodos mais utilizados para a avaliação de dormência destacam-se o teste de estacas de uma só gema (RAGEAU, 1978), que consiste na avaliação de brotação de gemas isoladas em fragmentos de ramo, que são submetidos a condições de temperatura e fotoperíodo favoráveis ao crescimento. Os dados de TMB são associados a endodormência pois remove-se a paradormência de longa distância (nó/gema isolada) e é suprimida a ecodormência na câmara de crescimento (PERTILLE, 2021). Observa-se no estudo realizados por Sachet (2014), que o TMB a partir de 12 dias não há mais endodormência, apenas necessidade de calor, o que caracteriza ecodormência.

### 3.4 ANALISE DA EXPRESSÃO GÊNICA NA AGRICULTURA

A biotecnologia pode fornecer meios para aumentar a produção agrícola pela aplicação do conhecimento molecular em função dos genes envolvidos na tolerância a estresses, desenvolvimento e crescimento em espécies vegetais

((TAKEDA; MATSUOKA, 2008). Entre os métodos usados para avaliar a diversidade genética, destacam-se os marcadores bioquímicos e moleculares. Dessa forma, entender a influência do ambiente na regulação da brotação da macieira, permite que pesquisadores atuem em novas metodologias da biotecnologia contribuindo para apontar novas estratégias e reduzir os efeitos do clima na produtividade de frutíferas como a macieira.

Existem muitos tipos de protocolos e muitos kits comerciais para a extração que se adaptam a diversos tipos de amostras. Para cada tipo de tecido podem ser testadas adaptações, de acordo com as características de cada espécime a ser analisado (OLIVEIRA *et al.*, 2007). É preciso levar em consideração a otimização do rendimento e a degradação dos ácidos nucleicos durante a extração, custo, tempo, simplicidade da metodologia e o tipo de resíduos gerados.

O protocolo mais utilizado para isolar RNA é baseado no método fenoltiocianato de guanidina, ou comercialmente disponível como o reagente Trizol®, mas que se mostra inadequado para alguns tecidos e espécies vegetais (OLIVEIRA, 2018). A obtenção de RNA de boa qualidade é o ponto de partida para diversos processos que visam avaliar e quantificar a expressão de genes. Diversos estudos descrevem protocolos de extração diferentes para tecidos vegetais ricos em polifenóis ou polissacarídeos, que são os tecidos que impõe uma maior dificuldade para isolamento de boa quantidade de RNA e de alta qualidade (OLIVEIRA, 2018).

### 3.4 CULTIVARES ESTUDADAS

As principais cultivares produzidas no Brasil são Gala, Fuji e Eva (MARIANO, 2015). No ano de 1979, o Instituto Agrônomo do Paraná realizou o cruzamento entre as cultivares Anna e Gala, resultando na cultivar Eva, denominada inicialmente de Seleção IAPAR 75. Eva, é cultivar que apresenta baixa exigência em frio, entre 330-350 unidades de frio, alta produtividade e frutos de excelente qualidade. É uma cultivar recomendada para regiões onde ocorre entre 100 e 350 HF abaixo de 7 °C (HAUAGGE; TSUNETTA, 1999). Em regiões onde há ocorrência de geadas, o cultivo deve ser evitado, pois é uma cultivar suscetível ao congelamento.

Resultante do cruzamento 'Ralls Janet' x 'Delicious', realizado em 1939 em Fujisaki no Japão, a cultivar Fuji foi introduzida no Brasil em 1967 (Patto, 2017). A cultivar Fuji, requer acúmulo de frio entre 700 a 800 HF abaixo de 7,2 °C (Petri, Palladini, Pola, e EPAGRI, 2006).

Procedente do cruzamento entre 'Kidd's Orange Red' e 'Golden Delicious', realizado em 1934 por J.H. Kidd, na Nova Zelândia (CAMILO; DENARDI; EPAGRI, 2006), as cultivares do grupo 'Gala' apresentam média necessidade de frio, de 600 HF (horas de frio) abaixo de 7,2 °C (PETRI; PALLADINI; POLA, 2006). Essa cultivar apresenta dezenas de clones com características variáveis quanto à intensidade e distribuição de cor na epiderme.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado nesse trabalho foi coletado em pomar comercial situado no município de Palmas, Sudoeste do Paraná, na propriedade do senhor Geraldo Lovo. As cultivares avaliadas foram 'Eva', 'Fuji Suprema' e 'Galaxy'. O clima de Palmas, segundo a classificação de Köppen, é o Cfb, Temperado, com temperaturas médias, no mês mais quente inferior a 22 °C e no mês mais frio inferior a 18 °C, super-úmido, com precipitação pluviométrica em torno de 2250 mm (ALVARES *et al.*, 2013). A implantação do pomar foi no ano de 1999 em sistema adensado com 2.857 plantas ha<sup>-1</sup>, com tutoramento para 'Fuji Suprema' e 'Galaxy' sobre porta-enxerto 'M.9' e 'Eva' no sistema adensado com 2.631 plantas ha<sup>-1</sup>, sem tutoramento, com porta-enxerto 'Marubakaido' e inter-enxerto de 15 cm de 'M.9'. A disposição das cultivares no pomar é de duas filas de 'Gala' intercaladas com uma fila de 'Fuji', e a cultivar Eva apresenta como polinizadora a cultivar Princesa intercalada a cada 10 plantas de 'Eva'.

### 4.1 DADOS CLIMÁTICOS

Os dados de temperatura diária, em Palmas-PR, foram registrados pela estação automática localizada no Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR). Calculou-se o número de horas com temperatura  $\leq 7,2$  °C a partir de 1 de abril.

### 4.2 TESTE DE UMA SÓ GEMA (RAGEAU, 1978).

Para a realização do teste de nós isolados, 20 ramos foram coletados em campo e seccionados em porções de 7 cm de comprimento, mantendo apenas a gema superior de cada segmento, as demais gemas foram removidas e os ferimentos isolados com fita parafinada. As estacas foram colocadas em espuma fenólica umedecida e mantidas a 25 °C ( $\pm 1$  °C) em câmara de crescimento com fotoperíodo de 16 horas. Foram registrados os tempos individuais das estacas, decorridos desde a colocação na câmara de crescimento até a brotação, de acordo

com os parâmetros de crescimento “Ponta Verde” (PV), o tempo decorrido entre a coleta até o estágio PV será computado como TMB.

### 4.3 EXTRAÇÃO DE RNA

Foram utilizadas três amostras de lenho da cultivar Eva, cortadas em porções de aproximadamente 5 mm e armazenadas em tubos de centrífuga com capacidade de 2 ml em ultra freezer – 45 °C até o momento das extrações de RNA.

Foram testados quatro protocolos para a extração de RNA em lenho de macieira para estabelecer um método eficiente de extração. O valor estimado para a extração de RNA, em cada protocolo, considerou os custos dos reagentes. No entanto, o custo da mão-de-obra e o desgaste dos equipamentos não foram incluídos. O tempo de execução de cada método foi determinado considerando o tempo para execução das principais etapas para cada método.

#### 4.3.1 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL PELO MÉTODOS DE (SALZMAN *ET AL.*, 1999)

Foram macerados 200 mg de lenho de macieira, em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo. O material macerado foi transferido para um tubo de centrífuga com capacidade de 2 mL. Em seguida, adicionou-se 1 µL de solução tampão (anexo A), seguido de agitação em vórtex por 1 minuto. Adicionou-se um volume de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico (24:1)), agitando por 20 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 16.000 x g por 10 minutos a 4 °C. A fase superior foi transferida para um novo tubo, adicionando 2 volumes de etanol 100% e 0,1 volume de NaCl 5M, seguida de precipitação *overnight* a -2 °C. Após, nova centrifugação a 16.000 x g, por 10 minutos a 4 °C, o pellet foi ressuscitado em 1 µL de água DEPC 0,1%, 1 volume de fenol saturado em TE (pH 8,0): clorofórmio: álcool isoamílico na proporção 25:24:1. Após agitação por 10 minutos, à temperatura ambiente, seguida de centrifugação a 13.000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente, transferindo a fase superior para um novo tubo e adicionou-se 2 volumes de etanol 100% e 0,1 volume de NaCl 5M, seguida de precipitação *overnight* a -2 °C. Centrifugou-se a



16.000 x g, por 15 minutos a 4 °C, ressuspensão o pellet formado em 500 µL água DEPC 0,1%. Completou-se a amostra para 1 mL com água DEPC e adicionou-se 333 µL de LiCl 8M. A precipitação foi feita a 4 °C, por 3 horas em ambiente refrigerado, antes da centrifugação a 12.000 x g, por 20 minutos a 4 °C. O precipitado foi lavado com etanol 80% e ressuspensão em 50 µL de água DEPC 0,1% e armazenado a temperatura de -10 °C.

#### 4.3.2 EXTRAÇÃO DE RNA PELO MÉTODO (ZENG; YANG, 2002)

Foram aquecidos 15 mL de tampão de extração as 65 °C em banho maria, por 60 minutos. Macerou-se o tecido vegetal 200 mg de lenho de macieira, em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo. O material macerado foi transferido para um tubo de centrífuga, onde continha 750 µL de tampão de extração, seguindo por agitação (vórtex). Incubou-se o material a 65 °C, por 10 x minutos, adicionando igual volume de CIA e misturou-se. Centrifugou-se a 10.000 x g por 15 minutos, a 4 °C. Transferindo o sobrenadante a um novo tubo, reextraído com igual volume de CIA. Seguida de uma nova centrifugação a 10.000 x g por 15 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 0,6 volumes de isopropanol e 0,1 volume de 3M, seguida de agitação em vórtex. As amostras foram armazenadas em -45 °C, por 25 minutos. Seguindo por agitação a 29.000 x g, por 20 minutos a 4 °C. Todo o líquido foi removido com o auxílio de uma pipeta, seguindo por ressuspensão o pellet em 20 µL de TE. Adicionou-se 0,25 volumes da solução de precipitação de LiCl 7,5M, a amostra foi agitada em vórtex e precipitada em overnight a -4 °C. Centrifugou-se a 29.000 g, por 45 minutos a 4 °C. Todo o sobrenadante foi removido com auxílio de uma pipeta, deixando o pellet formado, este foi lavado por 3 vezes com etanol 75%. Todo o líquido foi novamente removido, e o pellet seco em estufa a 37 °C. O pellet foi ressuspensão em 20 µL de TE e armazenado a temperatura de -10 °C.

#### 4.3.3 EXTRAÇÃO DE RNA PELO MÉTODO COM QUICK – ZOL®

Em um tubo de centrífuga com 200 mg de tecido vegetal, acrescentou-se 500 µL de Triazol, e agitou-se em vórtex. Seguido de um banho maria por 5 minutos a temperatura de 25 °C. Em seguida, adicionou-se 100 µL de clorofórmio, seguido de vórtex e banho maria por 15 minutos a 25 °C. Centrifugou-se a 12.000 x g, por 15 minutos a 4 °C, transferindo o sobrenadante para um novo tubo, onde foi adicionado 250 µL de isopropanol, misturando por imersão. Em seguida, deixou-se em banho maria por 10 minutos a 25 °C. Uma nova centrifugação a 12.000 x g, por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 0,5 µL de etanol 75%. Seguiu por uma nova centrifugação a 7.500 x g, por 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o pellet dissolvido em 15 µL de água DEPC e armazenado a -10 °C.

#### 4.3.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL COM PURE LINK PLANT RNA REAGENT (INVITROGEN®)

Adicionou-se 500 µL do reagente gelado em um tubo de centrífuga com 200 mg de tecido vegetal. A amostra foi agitada em vórtex, incubando-se por cinco minutos a temperatura ambiente. Centrifugou-se a amostra por 15 minutos a 12000 x g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo, adicionando-se 100 µL de NaCl (5 M). Em seguida, acrescentou-se 300 µL de clorofórmio, centrifugando as amostras a 12.000 x g, por dez minutos a 4 °C. A parte superior foi transferida para outro microtubo e adicionou-se igual volume de álcool isopropanol. Manteve-se a mistura em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. Procedeu-se a uma nova centrifugação nas condições anteriormente descritas. Removeu-se o sobrenadante, e ao pellet adicionou-se 1,0 mL de etanol 75%. Centrifugou-se a temperatura ambiente a 12.000 g por 1 minuto e retirou-se o líquido. O RNA extraído foi ressuspendido em 20 µL de água DEPC e armazenado a -10 °C.

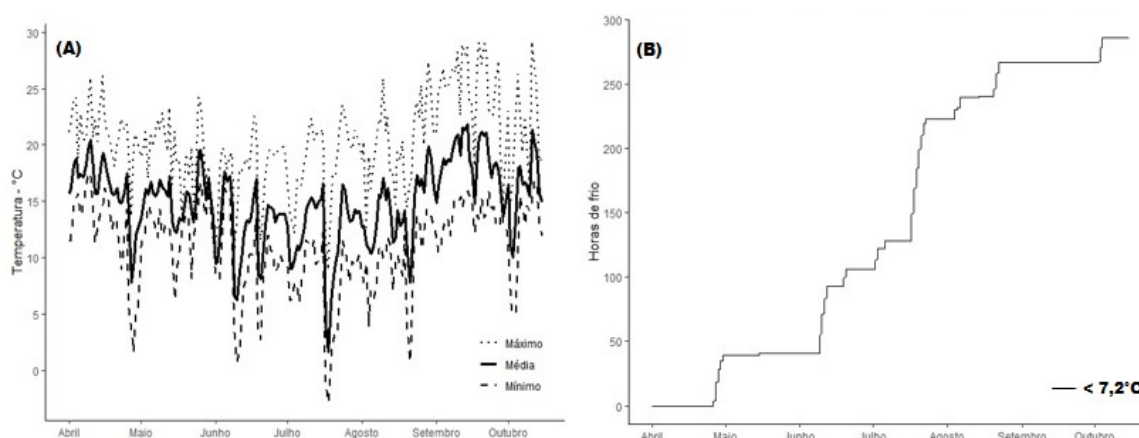
#### 4.3.5 ELETROFORESE DO RNA

Para verificar a integridade do RNA extraído, as amostras foram analisadas em gel de agarose (agarose e TBE). O tampão de carregamento foi o azul de bromofenol e glicerol e corado com fluorescente gelRed. A eletroforese procedeu a 80 V por uma hora. O gel foi visualizado em transiluminador e as imagens documentadas em fotodocumentador modelo L – Pix Chemi (Loccus).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os dados climáticos apresentados na Figura 1A mostram que de maneira geral 2017 foi o ano no qual o frio ocorreu na época esperada (de maio a agosto). O acúmulo total de horas frio abaixo de 7,2 °C, foi de 286 horas (Figura 1B). Dessa forma, o acúmulo de frio ocorrido durante o ano atendeu a necessidade de frio somente da cultivar Eva, que necessita de 100 a 350 HF (HAUAGGE; TSUNETA, 1999). Consideradas cultivares de alta exigência de frio, acima de 700 HF (PETRI; PALLADINI; POLA, 2006), as cultivares Gala e Fuji não tiveram o acúmulo de frio necessário.

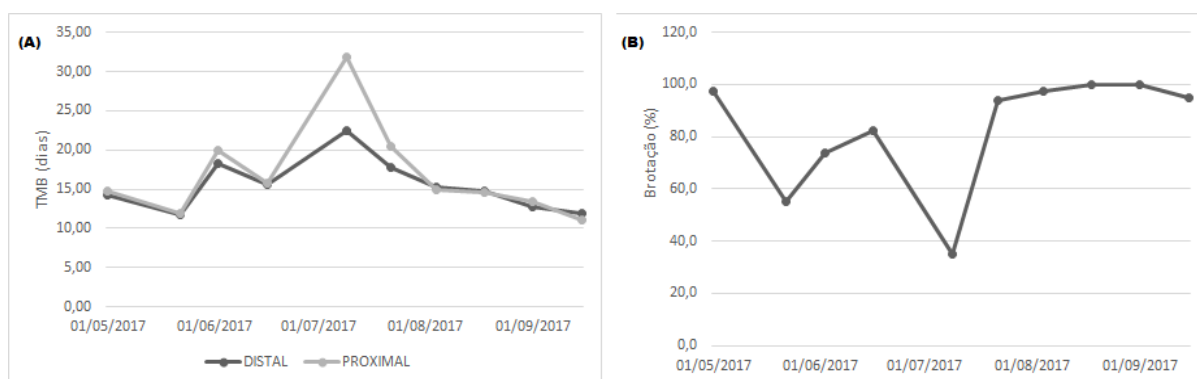
Figura 1--Temperaturas diárias em °C (A) e número de horas abaixo de 7,2 °C (B), registrados pela estação meteorológica do IAPAR, em Palmas-PR, no ano de 2017. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2020.



Para a cultivar Fuji, o TMB comportou-se de maneira semelhante para ambas as porções do ramo, com redução inicial seguido de aumento até ponto máximo seguida de um decréscimo. O maior TMB foi observado na coleta do início de julho, com 22,5 dias para a porção distal e 31,8 para a porção proximal e brotação de 35% (Figura 2A), indicando endodormência superficial. Já em estudos realizados por Malagi (2014) em região clima frio (Marsillargues – França), plantas de macieira apresetaram um elevado TMB uma taxa de brotação quase a zero, podendo distinguir as três fases da dormência. Algumas coletas se destacam pela combinação de alto TMB acompanhado pela redução de brotação (Figura 2B). A

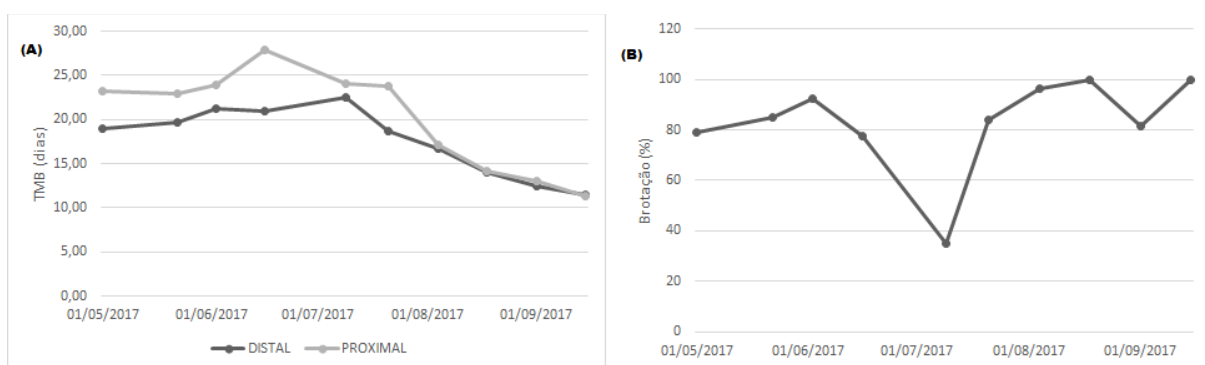
partir de agosto, o TMB reduziu e o percentual de brotação aumentou, saindo da endodormência.

Figura 2--Tempo médio de brotação (A) e percentagem de brotação (B) em ramos de macieira da cultivar Fuji, coletados em um pomar comercial na cidade de Palmas, PR. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2020.



Apesar de não apresentar um pico bem definido de TMB para a cultivar Gala, a planta apresentou valores maiores ou iguais a porção distal em todas as coletas. Com TMB máximo de 27,9 dias na segunda semana de junho para a porção proximal e 22,5 dias para a porção distal no início de julho (Figura 3A), coincidindo com a menor percentagem de brotação (Figura 3B).

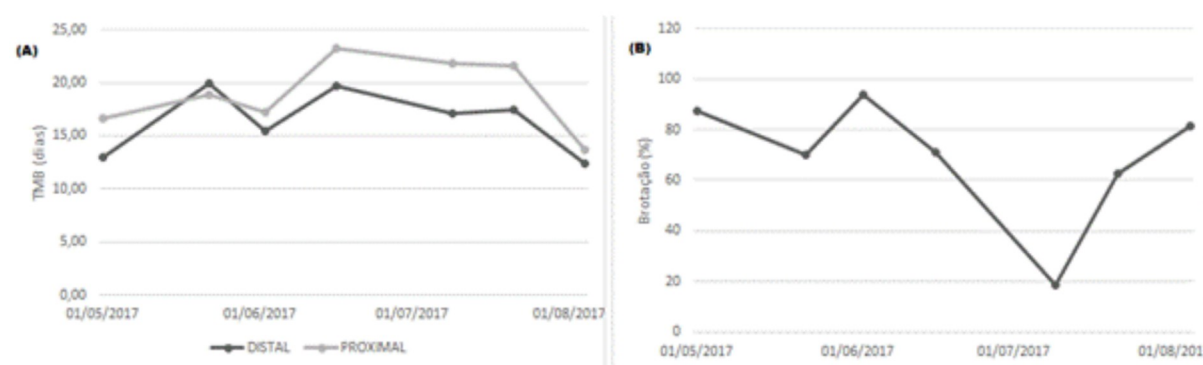
Figura 3--Tempo médio de brotação (A) e percentagem de brotação (B) em ramos de macieira da cultivar Gala, coletados em um pomar comercial na cidade de Palmas, PR. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2020.



De maneira geral a cultivar Eva teve comportamento semelhante entre as duas porções do ramo. A porção proximal apresentou maior TMB em quase todas as coletas, exceto na coleta de final de maio, onde a porção distal apresentou valor

superior, mostrando a não ocorrência de acrotonia, ou seja, não houve dominância apical, o que comprometeria a adequada floração e brotação das plantas, especialmente em regiões de inverno ameno (PATTO, 2017). Os valores máximos de TMB ocorreram em meados de junho, com TMB máximos de 23,2 e 19,7 dias, nas porções proximal e distal, respectivamente (Figura 4A).

Figura 4--Tempo médio de brotação (A) e percentagem de brotação (B) em ramos de macieira da cultivar Eva, coletados em um pomar comercial na cidade de Palmas, PR. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2020.



## 5.2 EXTRAÇÃO DE RNA

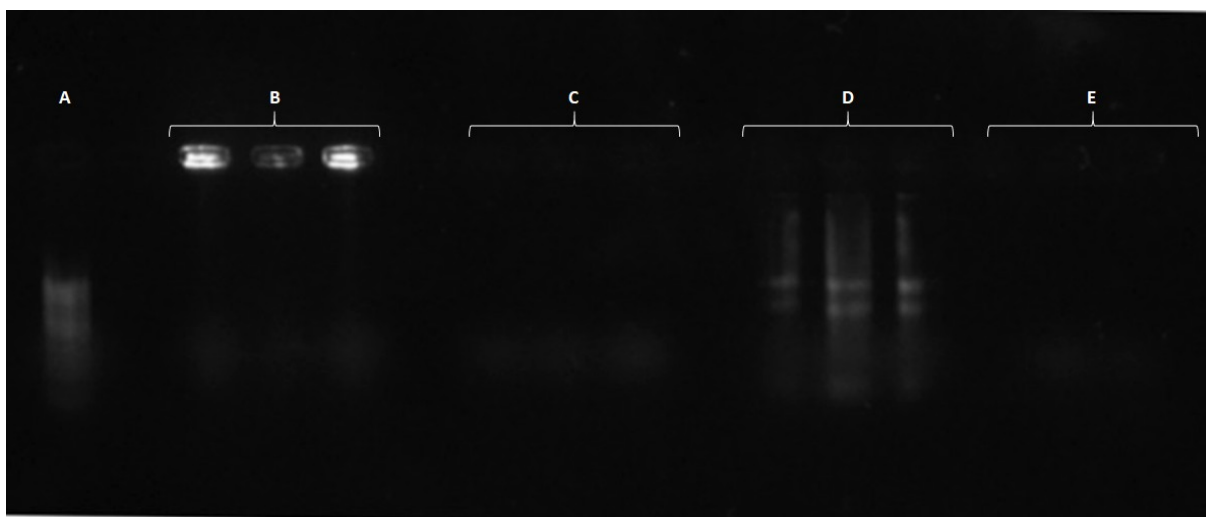
Os extratos provenientes das extrações pelo método descrito por Salzman *et al.* (1999), Zeng e Yang (2002) e Quick-Zol não apresentaram RNAs de boa qualidade, não sendo possível visualizar bandas no gel de agarose (Figura 5).

A não obtenção de RNA pode ser explicado por esses protocolos serem utilizados principalmente para extrações de RNA em tecidos foliares.

No gel de agarose pode-se observar que somente o método de *PureLink™ Plant RNA Reagent* apresentou duas bandas, caracterizando um isolamento de RNA puro. Tal isolamento, baseia-se na desnaturação das células, liberando os ácidos nucleicos e impedindo a ação de ribonucleases. Uma análise mais detalhada a respeito da integridade, quantidade (concentração) e pureza do RNA isolado poderia ser obtida por meio de análise espectrofotométrica, analisando a absorbância das amostras nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm, analisando assim a

relação 260/230 (cuja proporção desejada para indicar pureza é de 1,8). Por motivos de força maior, esta análise não pode ser realizada no presente estudo.

Figura 5--Eletroforese em gel de agarose 1% do RNA extraído com diferentes protocolos. A - Marcador de peso molecular. B – Quick-Zol®. C – Zeng e Yang (2002). D – PureLink™ Plant RNA Reagent®. E – Salzman *et al* (1999) adaptado. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2020.



### 5.3 ESTIMATIVA DE CUSTO E DE TEMPO

O tempo de extração de RNA dos protocolos testados variou de 51 a 670 minutos, sendo o protocolo PureLink™ Plant RNA Reagent® o mais rápido e o descrito por Zeng e Yang (2002) o mais demorado (Tabela 1). O tempo total de extração dos protocolos descritos por Salzman *et al* e o descrito por Zeng e Yang mostram-se com tempo superior dos demais por apresentarem uma etapa de precipitação em *overnight*.

O tempo de extração de RNA dos protocolos testados variou de 51 a 670 minutos, sendo o protocolo PureLink™ Plant RNA Reagent® o mais rápido e o descrito por Zeng e Yang (2002) o mais demorado (Tabela 1). O tempo total de extração dos protocolos descritos por Salzman *et al*. e o descrito por Zeng e Yang mostram-se com tempo superior dos demais por apresentarem etapas de precipitação em *overnight*.

Tabela 1 – Tempo gasto, em minutos, e custo dos reagentes utilizados em cada amostra nas principais etapas dos protocolos para extração de RNA em lenho de macieira (R\$)\*.

|                        | <b>Protocolo</b>             |                           |                                |  |
|------------------------|------------------------------|---------------------------|--------------------------------|--|
|                        | <b>Salzman et al. (1999)</b> | <b>Zeng e Yang (2002)</b> | <b>Quick – Zol<sup>®</sup></b> | <b>PureLink™ Plant RNA Reagent<sup>®</sup></b> |
| <b>Tempo (minutos)</b> | 555                          | 670                       | 60                             | 51   |
| <b>Custo (R\$)</b>     | 14,16                        | 0,07                      | 3,93                           | 6,81   |

\*Valor de cada reagente por grama ou mililitros.

Os custos dos reagentes variaram de R\$ 0,07 a R\$ 14,16 por amostra (Tabela 1). Na maioria dos protocolos de extração de RNA de plantas, a eliminação de contaminantes se dá pela utilização de tampões de extração que possuem  $\beta$ -mercaptoetanol e/ou PVP, sendo ainda necessária uma ou mais etapas de purificação (TAMARI *et al.*, 2013), onerando o processo, aumentando o tempo e reduzindo a segurança dos processos de extração, pois são reagentes altamente tóxicos.



## 6 CONCLUSÕES

Plantas cultivadas em regiões de clima de inverno ameno tendem a não apresentar endormência profunda em função das condições climáticas locais.

O reagente *PureLink™ Plant RNA Reagent* foi apresentado resultados mais eficientes na extração de RNA a partir do lenho de macieira.

O processo de extração de ácidos nucleicos pode ocorrer com diferentes protocolos, porém, a escolha do melhor método poderá levar em conta custo, tempo, resíduo, qualidade e quantidade que são fatores essenciais na escolha do método.

## REFERÊNCIAS

ALVARES, Clayton Alcarde; STAPE, José Luiz; SENTELHAS, Paulo Cesar; GONÇALVES, José Leonardo de Moraes; SPAROVEK, Gerd. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711–728, 2013.

ANZANELLO, R. Fisiologia e modelagem da dormência de gemas em macieira. 2012.

CAMILO, A.; DENARDI, F.; EPAGRI. A cultura da macieira. In: EPAGRI (Ed.). **A cultura da macieira**. Cultivares: Descrição e comportamento no sul do Brasil. [s.l.: s.n.]. p. 113–168.

CARDOSO, Loana Silveira. **Modelagem aplicada à fenologia de macieiras' Royal Gala'e'Fuji Suprema'em função do clima, na região de Vacaria, RS**. PhD Thesis —<https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/33327>: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

CARDOSO, Loana Silveira; BERGAMASCHI, Homero; BOSCO, Leosane Cristina; PAULA, Viviane Aires de; MARODIN, Gilmar ArduinoBettio; CASAMALI, Bruno; NACHTIGALL, Gilmar Ribeiro. Disponibilidades climáticas para macieira na região de Vacaria, RS. **Ciência Rural**, v. 42, n. 11, p. 1960–1967, 2012.

CARVALHO, Ruy Inacio Neiva de; ZANETTE, Flávio. Dinâmica da dormência de gemas de macieira “Imperial Gala” durante o outono e inverno em região de baixa ocorrência de frio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 65–68, 2004.

EREZ, Amnon. Bud dormancy; phenomenon, problems and solutions in the tropics and subtropics. In: **Temperate fruit crops in warm climates**. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-3215-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-017-3215-4_2): Springer, Dordrecht, 2000. p. 17–48.

FALAVIGNA, Vítor da Silveira; PORTO, Diogo Denardi; SILVEIRA, Carolina Pereira; REVERS, Luís Fernando. Recent advances in genetics and molecular control of bud dormancy in pipfruits. In: **Advances in plant dormancy**. [s.l.] Springer, 2015. p. 107–122.

FAOSTAT. **Índice de produção mundial de Maçã**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QI>.

FAUST, M. *et al.* Bud dormancy in perennial fruit trees: physiological basis for dormancy induction, maintenance, and release. **HortScience**, v. 32, n. 4, p. 623–629, 1997.

FERRÃO, Romário Gava; MOREIRA, Sarah Ola; FERRÃO, Maria Amélia Gava; RIVA, Elaine Minelli; ARANTES, Lúcio de Oliveira; COSTA, Adelaide de Fátima Santana da; CARVALHO, Pedro Luís Pereira Teixeira de; GALVÊAS, Pedro Arlindo Oliveira. Genética e melhoramento: desenvolvimento e recomendação de cultivares

com tolerância à seca para o Espírito Santo. **Incaper em Revista**, v. 6, n. 4, p. 51–71, 2016.

FRANCESCATTO, Poliana. **Desenvolvimento das estruturas reprodutivas da macieira (*Malus domestica* Borkh.) sob diferentes condições climáticas: da formação das gemas à colheita dos frutos**. PhD Thesis —<https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/128818>: Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

GOMES, Ligian Cristiano; NETO, Ricardo Stedile. **A contribuição da cadeia produtiva da maçã na organização espacial de São Joaquim/-SC**. [s.l.: s.n.].

HAUAGGE, Roberto; TSUNETTA, Munenobu. “ IAPAR 75-Eva”, “ IAPAR 76-Anabela” e “ IAPAR 77-Carícia”-Novas cultivares de macieira com baixa necessidade em frio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 21, n. 3, p. 239–242, 1999.

HAWERROTH, Fernando José; HERTER, Flavio Gilberto; PETRI, José Luiz; LEITE, Gabriel Berenhauser; PEREIRA, José Francisco Martins. **Dormência em frutíferas de clima temperado. Embrapa Clima Temperado-Documents (INFOTECA-E)**. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/884602/1/documento310.pdf>: Embrapa Clima Temperado, 2010.

IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. <https://seapi.rs.gov.br/upload/arquivos/201904/25164634-lspa-pesquisa-mensal-de-previsao-e-acompanhamento-junho-de-2016.pdf>: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2016. Disponível em: <https://seapi.rs.gov.br/upload/arquivos/201904/25164634-lspa-pesquisa-mensal-de-previsao-e-acompanhamento-junho-de-2016.pdf>.

KIRST, Bernardo Benno. *et al.* Anuário Brasileiro de Maçã 2016. **Anuário Brasileiro de Maçã**, n. 2446–8657, p. 88, 2016.

LANG, GA; EARLY, JD; ARROYAVE, NJ; DARNELL, RL; MARTIN, GC; STUTTE, GW. Dormancy: toward a reduced, universal terminology. **HortScience (USA)**, v. 20, p. 809–811, 1985.

LANG, GA; EARLY, JD; MARTIN, GC; DARNELL, RL. Endo-, para-, and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. **HortScience**, v. 22, n. 3, p. 371–377, 1987.

LEITE, Carla Daiane. **Extrato de alho e óleo vegetal na quebra de dormência de gemas e no controle de doenças da videira**. Master's Thesis—<http://docplayer.com.br/38497157-Extrato-de-alho-e-oleo-vegetal-a-quebra-de-dorme-cia-de-gemas-e-o-co-trole-de-doe-cas-da-videira-u-iversidade-estadual-do-ce-tro-oeste-u-ice-tro.html>: Universidade Estadual do Centro Oeste, 2010.

MALAGI, G. Lowering phenology and dormancy dynamics of apple tree in contrasting climatic conditions: a case study of phenology modeling in the climate warming context. 2014.

MARIANO, Livia Costa. **Variabilidade genética de uma coleção de genótipos de macieira do programa de melhoramento do IAPAR**. Master's Thesis —[http://www.unicentroagronomia.com/imagens/noticias/dissertacao\\_livia.pdf](http://www.unicentroagronomia.com/imagens/noticias/dissertacao_livia.pdf): Universidade Estadual do Centro-Oeste, 2015.

OLIVEIRA, Leonardo Furtado de. **Estudo de expressão gênica em pau-ferro: estratégias otimizadas para a detecção e análise de genes associados com tolerância à seca**. Master's Thesis —<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/190178/1/Dissertacao-Leonardo.pdf>: Universidade Federal do Piauí, 2018.

OLIVEIRA, Marcia Cristina de Sena; REGITANO, Luciana Correia de Almeida; ROESE, Alexandre Dinnys; ANTHONISEN, Denilson Gouvea; PATROCINIO, Epaminondas do; PARMA, Marcia Maria; SCAGLIUSI, Sandra Maria Mansur; TIMÓTEO, Wilston Henrique Belem; BELICUAS, Silvia Neto Jardim. **Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase**. <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/48295/1/LivroProtMolecular.pdf>: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2007.

PATTO, L. S. **Acrotonia da brotação de macieira em região de inverno ameno**. Master's Thesis—<https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/2287>: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2017.

PERTILLE, R. H. Influência do ambiente na heterogeneidade de brotação e floração de macieiras. 2021.

PETRI, JL; PALLADINI, LA; SCHUCK, E; DUCROQUET, JPH; MATOS, CS; POLA, AC. **Dormência e indução da brotação de fruteiras de clima temperado**. <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=AGB.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=171696>: EPAGRI, 1996. 110 p., 1996.

PETRI, José Luiz; LEITE, Gabriel Berenhauer; COUTO, Marcelo; FRANCESCATTO, Poliana. Avanços na cultura da macieira no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. SPE1, p. 48–56, 2011.

PETRI, JL; PALLADINI, LA; POLA, AC. Dormência e indução da brotação da macieira. In: **A cultura da macieira**. [s.l: s.n.]. p. 261–297.

RAGEAU, Rémy. Comptes rendus hebdomadaires des seances. Serie D. Sciences naturelles. **Comptes rendus hebdomadaires des seances. Serie D. Sciences naturelles**, v. 287, p. 1119–1122, 1978.

RECH, Samara; CARIO, Silvio Antonio Ferraz; AUGUSTO, Cleiclele Albuquerque. Avaliação conjuntural da produção e comercialização da maçã em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul: aspectos comparativos. **Indicadores Econômicos FEE**, v. 42, n. 1, p. 89–106, 2014.

SACHET, M. R. **Análises biológicas e bioquímicas na dinâmica da dormência de macieiras em Palmas-PR**. Master's Thesis

—<https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/874>: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2014.

SACHET, M. R. Análise da dormência e tolerância ao frio de macieiras cultivadas em condições de inverno ameno. 2018.

SALZMAN, RA; FUJITA, T; ZHU-SALZMAN,K; HASEGAWA, PM; BRESSAN, RA. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 17, n. 1, p. 11–17, 1999.

SCARIOTTO, Silvia. **Fenologia e componentes de rendimento de pessegueiro em condições subtropicais**. Master's Thesis

—<http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/268>: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2011.

SRIVASTAVA, Kk; AHMAD, N; DAS, B; SHARMA, OC; SINGH, SR; RATHER, JA. Genetic divergence in respect to qualitative traits and their possible use in precision breeding programme of apple (*Malus domestica*). **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 83, n. 11, p. 1217–20, 2013.

TAKEDA, Shin.; MATSUOKA, Makoto. Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population changes. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 6, p. 444–457, 2008.

TAMARI, F.; HINKLEY, C. S.; RAMPRASHAD, N. A comparison of DNA extraction methods using *Petunia hybrida* tissues. **Journal of biomolecular techniques: JBT**, v. 24, n. 3, p. 113, 2013.

WAGNER JÚNIOR, Américo; BRUCKNER, Claudio Horst; SILVA, José Osmar da Costa; SANTOS, Carlos Eduardo Magalhães dos; PIMENTEL, Leonardo Duarte; MAZARO, Sérgio Miguel. Adaptação de genótipos de pessegueiro F2 para condições de baixo acúmulo de frio hiberna. **Bragantia**, v. 69, n. 4, p. 815–822, 2010.

ZENG, Ying.; YANG, Tao. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. **Plant molecular biology reporter**, v. 20, n. 4, p. 417–417, 2002.

**ANEXOS**

**PROTOCOLO MODIFICADO DE EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL (SALZMAN, 1999)**

1. Macerar 2 g de tecido e adicionar 10 mL do tampão de extração\*;
2. Agitar vigorosamente por 1 minuto;
3. Adicionar 1 volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e agitar por 20 minutos;
4. Centrifugar a 16.000 g por 10 minutos a 4 °C;
5. Transferir a fase superior para outro tubo;
6. Repetir os passos 3 e 4 até a interfase estar limpa;
7. Remover o sobrenadante para um novo tubo;
8. Adicionar 2x o volume de etanol 100% e 0,1 x do volume de NaCl 5M;
9. Precipitar *overnight* a -2 °C;
10. Centrifugar a 16.000 g por 10 minutos a 4 °C;
11. Ressuspender o pellet em 10 mL de água DEPC 0,1%;
12. Adicionar 1x de fenol saturado em TE (pH 8,0): clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e agitar por 10 minutos a temperatura ambiente;
13. Centrifugar a 13.000 g por 10 minutos a temperatura ambiente;
14. Transferir a fase superior para um novo tubo;
15. Repetir os passos 12 e 13 até a interfase estar limpa;
16. Adicionar a fase superior 2 x do volume de etanol 100% e 0,1 x do volume de NaCl 5M;
17. Precipitar *overnight*;
18. Centrifugar a 16.000 g por 15 minutos a 4 °C;
19. Ressuspender o pellet em 500 uL de água DEPC 0,1%;
20. Completar o volume para 1 mL com água DEPC e adicionar 333 uL de LiCl 8M;
21. Precipitar por 3 h em ambiente refrigerado;
22. Centrifugar a 12.000 g por 20 minutos a 4 °C;
23. Lavar o pellet com etanol 80%;
24. Remover o etanol e ressuspender o pellet em 50 uL de água DEPC 0,1%;

\*Tampão de extração (SALZMAN, 1999):

|                         |                    |
|-------------------------|--------------------|
| Tiocianato de guanidina | 4 M                |
| Tris – Hcl pH 8,0       | 100 mM             |
| Citrato de sódio pH 8,0 | 25 mM              |
| Sarcosina N-lauril      | 0,5%               |
| PVP solúvel             | 1%                 |
| Beta-mercaptoetanol     | 2%                 |
| Água DEPC 0,1%          | completar o volume |