



RAFAELLA DE PAULA AVELAR

**REGULAÇÃO DO ETILENO EM CAFEEIROS CULTIVADOS
SOB DIFERENTES NÍVEIS DE DÉFICIT HÍDRICO**

Lavras- MG

2018

RAFAELLA DE PAULA AVELAR

**REGULAÇÃO DO ETILENO EM CAFEIROS CULTIVADOS SOB DIFERENTES
NÍVEIS DE DÉFICIT HÍDRICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Antonio Chalfun Júnior, PhD (UFLA/DBI)
Orientador

André Almeida Lima, PhD (UFLA/DBI)
Coorientador

Lavras MG

2018

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Avelar, Rafaella Paula De.

Regulação do etileno em cafeeiros cultivados sob diferentes
níveis de déficit hídrico / Rafaella de Paula Avelar. - 2018.
54 p.

Orientador(a): Antonio Chalfun Júnior.

Coorientador(a): André Almeida Lima.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Reidratação. 2. Anatomia. 3. Florescimento. I. Júnior,
Antonio Chalfun. II. Lima, André Almeida. III. Título.

RAFAELLA DE PAULA AVELAR

**REGULAÇÃO DO ETILENO EM CAFEIROS CULTIVADOS SOB DIFERENTES
NÍVEIS DE DÉFICIT HÍDRICO**

**ETHYLENE REGULATION IN COFFEE PLANTS GROWN UNDER DIFFERENT
LEVELS OF WATER DEFICIT**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2018

Dr. André Almeida Lima- UFLA

Dr. Antônio Paulino da Costa Netto-UFG

Antonio Chalfun Júnior, PhD (UFLA/DBI)
Orientador

Lavras MG

2018

Dedico

Aos meus pais, Ivone e Sebastião, incansáveis na tarefa de oferecer a oportunidade de estudar e de continuar estudando; incansáveis na busca de sempre me mostrar todos os caminhos, para que eu os soubesse escolher. Dedico ao meu esposo Ronan pelo apoio incondicional e constante incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu **Deus**, por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Aos meus pais **Ivone** e **Sebastião** por terem me feito existir, por tanto amor, por tudo o que sou, por cada oração, por terem me proporcionado educação e amor pelos estudos, e, apesar das inúmeras dificuldades, por sempre me estimularem a continuar.

Aos meus irmãos **Luis Otavio** e **Gabriel** por me tornarem capaz de enfrentar novos desafios sabendo que vocês estarão sempre ao meu lado.

Ao meu querido esposo, **Ronan**, por ser tão importante na minha vida. Sempre ao meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado.

A Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de iniciar os estudos na Pós-Graduação e estrutura oferecida para minha formação. Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal pelos ensinamentos e crescimento profissional fornecido.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Antonio Chalfun Júnior, pela orientação, total apoio, disponibilidade, pelo saber que transmitiu, pelas opiniões e críticas, total colaboração no solucionar de dúvidas e problemas que foram surgindo ao longo da realização deste trabalho e por todas as palavras de incentivo.

Ao pós-doutorando André Lima pela colaboração em todas as etapas deste trabalho. Por toda paciência para ensinar-me, pelas conversas e conselhos que contribuíram para minha formação e contribuições científicas que enriqueceram esse trabalho.

Aos membros e ex-membros do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas pela carinhosa recepção, e pelo apoio em todas as etapas da realização deste trabalho. Em especial, aqueles que me ajudaram diretamente neste trabalho. Agradeço ao André, Kauane, Bruno, Carlos, Rafael, Bruno e Gabriel, pela disponibilidade de me ensinarem diversas técnicas laboratoriais. Agradeço ao Pedro pela gentileza de me ajudar nas análises estatísticas, e aos alunos de iniciação científica, Vitor, Isadora, Luisa Peloso, Luisa Sperandio e Gabriela pela ajuda

prestada nas atividades laboratoriais e no trabalho de campo. Enfim agradeço a todos os membros do laboratório pela ajuda e amizade.

RESUMO

A cafeicultura é historicamente uma atividade econômica de grande destaque no Brasil, sendo o país atualmente o maior produtor e exportador mundial de café. O cafeeiro apresenta floração do tipo gregária, ou seja, todas as plantas florescem ao mesmo tempo em uma determinada região, entretanto o número de floradas é variável, desde poucas como ocorre no Brasil até muitas como ocorre na Colômbia. O florescimento desuniforme provoca dificuldades relacionadas a colheitas parciais, controle doenças, controle de pragas, redução na qualidade dos grãos e aumento no custo de colheita. O florescimento do cafeeiro é dividido em três fases: iniciação ou diferenciação floral, repouso ou quiescência e abertura floral, com a antese sendo desencadeada pela precipitação ou irrigação após um período de déficit hídrico. A resposta à reidratação tem sido associada a um aumento nos níveis de etileno. Este aumento pode estar envolvido no controle da promoção da antese do cafeeiro. Existem evidências de que este aumento pode estar relacionado ao transporte do precursor do etileno (ACC) da raiz para a parte aérea via sistema vascular. Entretanto, o efeito do déficit hídrico sobre a regulação do etileno e sobre o desenvolvimento do sistema vascular é pouco compreendido. Portanto, estudos neste sentido são fundamentais para compreender o mecanismo de regulação do etileno e do desenvolvimento do sistema vascular em plantas sob déficit hídrico. A elucidação destes mecanismos pode auxiliar na compreensão da influência do etileno no florescimento em trabalhos futuros. Desta forma, este estudo testou a hipótese de que a reidratação provoca um aumento na produção de etileno na parte aérea e que o déficit hídrico afeta o desenvolvimento do sistema vascular em folhas do cafeeiro. Para testar esta hipótese foram feitas análises de expressão gênica e de anatomia. Nas análises de expressão foram analisados o nível de expressão dos genes de biossíntese e sinalização do etileno em mudas de café bem irrigadas e sob déficit hídrico, assim como após a reidratação. Nas análises anatômicas foram feitos cortes transversais em folhas jovens de plantas irrigadas e cultivadas sob estresse. As análises de expressão gênica sugerem que plantas sob déficit hídrico apresentam uma redução na produção de etileno na parte aérea e aumentam a síntese de ACC na raiz. Além disto, sugere que a reidratação provoca uma redução da produção de etileno nas folhas seguido de um aumento em sua síntese. Os dados de anatomia indicam que as folhas das plantas que crescem sob déficit hídrico apresentam maior número de vasos de xilema e maior área do floema.

Palavras chave: Reidratação. Anatomia. Florescimento.

Abstract

Coffee cultivation has historically been a major economic activity in Brazil, and Brazil is currently the world's largest producer and exporter of coffee. Coffee trees show flowering of the gregarious type, that is, all plants bloom at the same time in a certain region, however, the number of flowering events is variable, from few events like it occurs in Brazil, to many events as it occurs in Colombia. Asynchronous flowering causes difficulties related to partial harvesting, disease control, pest control, reduction in grain quality, and increases harvesting costs. Coffee flowering is divided into three stages: floral initiation or differentiation, rest or quiescence, and floral opening, or anthesis, being triggered by precipitation or irrigation after a period of water deficit. The response to rehydration has been associated with an increase in ethylene levels. This increase may be involved in the control of coffee anthesis promotion. There is evidence that this increase may be related to the transport of the ethylene precursor (ACC) from the roots to the shoot via the vascular system. However, the effect of water deficit on the regulation of ethylene and on vascular system development is poorly understood. Therefore, studies in this sense are fundamental to understand the mechanism of ethylene regulation and the development of the vascular system in plants under water deficit. The elucidation of these mechanisms may help to understand the influence of ethylene on flowering in future works. In this way, this study tested the hypothesis that rehydration causes a great increase in the ethylene production in the shoot and that water deficit affects the development of the vascular system in leaves of coffee trees. To test this hypothesis, analyzes of gene expression and anatomy were performed. In the gene expression analyzes, the expression levels of ethylene biosynthesis and signaling genes in well-watered and water deficit plants, as well as after plant rehydration, were analyzed. In the anatomical analyzes, cross sections were made in young leaves of well-watered and water deficit plants. The gene expression analyzes suggest that plants under water deficit show a reduction in the production of ethylene in the shoot and an increase the synthesis of ACC in the root. In addition, it is suggested that rehydration causes a reduction of the ethylene production in the leaves, followed by an increase in their synthesis. Anatomical data indicates that leaves from plants growing under water deficit have a larger number of xylem vessels and larger phloem area.

Keywords: Rehydration. Anatomy. Flowering.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquemática das seis fases fenológicas do cafeeiro arabica.....	17
Figura 2 - Escala detalhada das fases de desenvolvimento floral de <i>Coffea arabica</i>	18
Figura 3 - Diferentes níveis de assincronia de desenvolvimento de gemas encontradas em Cafeeiros.....	19
Figura 4 - Rota biossintética do etileno e ciclo de Yang.....	25
Figura 5 - Arquitetura dos cinco receptores de etileno encontrados em <i>Arabidopsis</i>	26
Figura 6 - Estrutura básica da rota de sinalização do etileno.....	27
Figura 7 - Estufa onde o experimento foi conduzido.....	29
Figura 8 - Blocos de historesina contendo cortes transversais de folhas de <i>Coffea arabica</i>	35
Figura 9 - Expressão gênica relativa do gene <i>CcRD29</i> em folhas de <i>Coffea arabica</i>	36
Figura 10 - Expressão gênica relativa dos genes <i>CaACS1-like</i> , <i>CaACO1-like</i> e <i>CaETR4-like</i>	38
Figura 11 - Corte transversal feito em folhas jovens de café.....	41
Figura 12 - Área do floema, número de vasos do xilema, área do xilema em folhas de <i>Coffea arabica</i> cultivadas sob déficit hídrico	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Tratamentos aplicados às mudas de café da cultivar Catuaí 144.....	30
Tabela 2: Sequência de <i>primers</i> e eficiência da amplificação por RT-qPCR.....	34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	O cafeeiro: aspectos botânicos e econômicos.....	15
2.2	Fenologia do Cafeeiro	16
2.3	Influência do Déficit Hídrico sobre o Florescimento do Cafeeiro	19
2.4	Regulação Hormonal Sob Déficit Hídrico.....	21
2.5	Etileno na Regulação do Florescimento	22
2.6	Influência do Etileno e do déficit hídrico sobre o Desenvolvimento do Sistema Vascular.....	23
2.7	Síntese e Sinalização do Etileno	24
2.8	Transporte do ACC a Longa Distância.....	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1	Local e período experimental	28
3.2	Material Vegetal e Delineamento Experimental	29
3.3	Instalação do Experimento	29
3.4	Análises Fisiológicas	30
3.4.1	Potencial Hídrico Foliar.....	30
3.5	Análises Moleculares.....	30
3.5.1	Coleta do Material	30
3.5.2	Extração de RNA.....	31
3.5.3	Tratamento com DNase	32
3.5.4	Síntese de cDNA	32
3.5.5	Análise da expressão gênica por RT- qPCR.....	32
3.6	Análises Anatômicas	34
3.6.1	Análises Estatísticas	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35

4.1	Expressão Gênica	35
4.2	Análises Anatômicas	40
5	CONCLUSÕES	44
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
	REFERENCIAL TEÓRICO.....	46

1 INTRODUÇÃO

O cultivo do cafeeiro é historicamente uma atividade econômica de grande destaque em diversos países do mundo, sendo o Brasil atualmente o maior produtor e exportador mundial de café (ICO, 2017; RIBEIRO, 2005). Originário do continente africano, o cafeeiro pertence ao gênero *Coffea L.* da família *Rubiaceae*, o qual apresenta 103 espécies identificadas (DAVIS et al., 2006). Dentre estas, somente *C. Arabica* e *C. Canephora*, apresentam importância econômica, sendo responsáveis por 76% e 24% da produção brasileira, respectivamente (CONAB, 2017).

O cafeeiro apresenta floração do tipo gregária, ou seja, todas as plantas florescem ao mesmo tempo em uma determinada região. Entretanto o número de floradas é variável, desde poucas como ocorre no Brasil até muitas como ocorre na Colômbia (SOARES et al., 2005; DE CAMARGO, 1985). O florescimento desuniforme provoca dificuldades relacionadas a colheitas parciais, controle doenças, controle de pragas, redução na qualidade dos grãos e aumento no custo de colheita (DAMATTA, 2004; RENA et al., 1986).

O processo de florescimento do cafeeiro é um fenômeno complexo, uma vez que após atingirem um tamanho definido as gemas florais entram em repouso para posteriormente iniciar a antese (GOUVEIA et al., 1984). Desta forma, o florescimento é dividido em três fases: iniciação ou diferenciação floral, repouso ou quiescência e abertura floral ou antese (CAMARGO & CAMARGO, 2001). Existem evidências de que períodos de seca, seguidos de chuva ou irrigação são necessários para quebrar a dormência da gema do cafeeiro (MAGALHAES; ANGELOCCI, 1976).

Foi proposto por CRISOSTO et al. (1992) que a quebra da dormência ocorre devido a modificações na sinalização da raiz com a parte aérea durante o período de deficiência hídrica e após o aumento do potencial hídrico, sugerindo que alguns mensageiros químicos, como os fitormônios, seriam capazes de tornar os botões florais aptos para antese, estimulando a floração em algumas espécies. No cafeeiro, a reidratação estimula a antese apenas nas gemas que se encontram no estágio G4 de desenvolvimento (CRISOSTO et al., 1992). A capacidade da gema de interagir com sinais endógenos e exógenos no estágio G4 parece estar relacionada com o desenvolvimento do sistema vascular. Gemas em fases anteriores a G4 apresentam pouca quantidade de elementos do xilema primário, e essa restrição anatômica limita a comunicação dessas gemas com estímulos emitidos pela raiz após um período de déficit hídrico (ALVIM, 1960; CRISOSTO et al., 1992). Entretanto, o efeito do déficit hídrico sobre o desenvolvimento vascular nas gemas do cafeeiro ainda não foi elucidado.

Com base no padrão de floração do cafeeiro, e considerando a necessidade de ciclos de desidratação e reidratação para indução floral, foi proposta a existência de uma conexão entre o etileno e a promoção do florescimento em café, de modo que esse hormônio atuaria como um indutor da abertura floral (LIMA, 2015, SANTOS, 2016). O etileno é um hormônio gasoso que é sintetizado em taxas reduzidas em todos os tecidos das plantas, e está envolvido com inúmeros eventos de crescimento e desenvolvimento vegetal, relacionando-se também com respostas das plantas sob diferentes condições de estresses bióticos e abióticos (ABELES, 1992). Estudos demonstram que o déficit hídrico pode provocar redução na produção de etileno dependendo do nível do estresse (NARAYANA, 1991; MORGAN et al., 1990), e que a reidratação pode provocar um rápido aumento na produção de etileno e no transporte de seu precursor ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) da raiz para a parte aérea (GOMEZ-CADENAS et al, 1996; LIU et al., 2013; TUDELA; PRIMO-MILLO, 1992).

O aumento na produção de etileno após a reidratação pode estar relacionado a indução floral em rosas (MENG et al., 2014) e em abacaxi (TRUSOV; BOTELLA, 2006). No cafeeiro, a reidratação provocou aumento na expressão dos genes da biossíntese e sinalização do etileno poucas horas após a reidratação, sendo sugerido que o cafeeiro acumula o precursor do etileno (ACC) na raiz durante o déficit hídrico e, após a reidratação este é transportado para a parte aérea onde é convertido em etileno (LIMA, 2015).

O efeito do déficit hídrico sobre a regulação do etileno e sobre o desenvolvimento vascular é pouco compreendido. Portanto, estudos neste sentido são fundamentais para compreender o mecanismo de regulação do etileno e do desenvolvimento do sistema vascular em plantas sob déficit hídrico. A elucidação destes mecanismos pode ajudar a compreender o papel do etileno no florescimento, bem como a importância do sistema vascular na transmissão de sinais das raízes para as gemas do cafeeiro em trabalhos futuros. Assim, com o objetivo de compreender o efeito do déficit hídrico sobre o mecanismo de regulação do etileno e sobre o desenvolvimento do sistema vascular, foram analisados os níveis de expressão e genes da biossíntese e sinalização do etileno em folhas e raízes de mudas de café durante o déficit hídrico e após a reidratação, bem como análises anatômicas em folhas jovens de mudas de café cultivadas sobre déficit hídrico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O cafeeiro: aspectos botânicos e econômicos

A cafeicultura representa uma importante fonte de renda para vários países da América Latina, África e Ásia (DAMATTA, 2004). No Brasil, o cultivo do cafeeiro é historicamente uma atividade econômica de grande destaque, sendo o país atualmente o maior produtor e exportador mundial de café (ICO, 2017; RIBEIRO, 2005). No ano de 2017 a produção total do país foi de 44,97 milhões de sacas beneficiadas, sendo 34,25 milhões de sacas da espécie arábica e 10,72 milhões de sacas da espécie conilon. No ano de 2018 a safra é de bienalidade positiva, sendo estimada uma produção entre 54,4 e 58,5 milhões de sacas beneficiadas de café no país (CONAB, 2018). Atualmente, os estados de Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo são os maiores produtores de café do Brasil, e no ano de 2017 apenas o estado de Minas Gerais produziu o equivalente a 54% da produção nacional (CONAB, 2017).

O cafeeiro tem sua origem em sub-bosques das florestas da Etiópia, região central da África, e sul do Sudão, localizadas a cerca de 1.600 a 2.000 metros de altitude, propensas a oscilações de temperaturas de 17°C a 26°C (CAMARGO; PEREIRA, 1994; LIVRAMENTO, 2010). É uma planta de porte arbustivo, da família Rubiaceae e do gênero *Coffea*, no qual compreendem 103 espécies, dentre os quais apenas *C. arabica* e *C. canephora*, apresentam importância econômica (DAVIS et al., 2006). *Coffea arabica* é uma espécie alotetraplóide ($2n = 4x = 44$ cromossomos) originada da hibridação natural de *C. canephora* como progenitor masculino e *C. eugenioides* como progenitor feminino (LASHERMES et al., 1999). É um arbusto monocaule, perene que alcança de 6 a 10 metros dependendo do tipo de condução (COSTE, 1955). A arquitetura da copa é cilíndrica em função do desenvolvimento da parte aérea sobre um ramo único que cresce verticalmente, denominado ortotrópico. A partir dele desenvolvem-se inúmeros ramos horizontais, denominados plagiotrópicos. Nesses ramos desenvolvem-se as gemas florais que originarão os frutos, de modo que, os ramos plagiotrópicos são também conhecidos como ramos produtivos (CARVALHO et al., 2008; MATIELLO et al., 2009). As folhas são ovaladas ou sublanceoladas, os bordos são ondulados, e geralmente medem cerca de 10 cm a 15 cm de comprimento por 4 cm a 6 cm de largura (CARVALHO et al., 2008; MATIELLO et al., 2009). Apresentam coloração predominante é verde escuro, sendo que a epiderme da superfície superior das folhas apresenta aspecto brilhante (CORTEZ, 2001). Quanto ao sistema radicular, a distribuição espacial das raízes não apresenta padrão definido, podendo alcançar até 2 metros de profundidade (ALVES, 2008; COSTE, 1955).

Quanto ao modo de reprodução, *C. arabica* é autógama, desta forma sua reprodução ocorre, principalmente por meio de autofecundação, chegando a ter 90% das suas flores fertilizadas pela junção de pólen e óvulo oriundos da mesma planta (SAKIYAMA et al., 1999). As flores são hermafroditas e agrupadas em conjuntos de 8 a 15, formando inflorescências denominadas glomérulos. A base de cada flor é composta por um pedicelo de 1 mm a 3 mm de comprimento e um cálice curto. As pétalas, geralmente em número de cinco, são soldadas formando a corola, que mede cerca de 8 mm a 10 mm longitudinais. A partir de cada pétala surge um filete curto, em cuja extremidade fixam-se anteras lineares de 6 mm a 8 mm. O pistilo é constituído de um tubo longo (12 mm a 15 mm) que se projeta, a partir do ovário até acima da corola, culminando com um estigma bifido. O fruto é uma drupa ovóide bilocular, que quando madura pode apresentar coloração vermelha ou amarela. Por causa da pouca importância do endocarpo, é frequentemente considerado como baga (CORTEZ, 2001).

2.2 Fenologia do Cafeeiro

Diferentemente da maioria das plantas que emitem as inflorescências na primavera e frutificam no mesmo ano fenológico, o cafeeiro necessita de dois anos para completar o seu ciclo fenológico, apresentando uma sucessão de fases vegetativas e reprodutivas (DE CAMARGO, 1985). Desta forma, o cafeeiro é classificado como uma planta bianual e o ciclo fenológico para cafeeiros da espécie *C. arabica*, nas condições climáticas tropicais do Brasil, pode ser dividido em seis fases distintas (Figura 1): 1) vegetação e formação das gemas foliares; 2) indução e maturação das gemas florais; 3) florada; 4) granação dos frutos; 5) maturação dos frutos e 6) repouso e senescência dos ramos terciários e quaternários (CAMARGO, A. D., & CAMARGO, 2001).

A primeira fase consiste na formação e desenvolvimento de nós com gemas axilares que formarão os ramos laterais responsáveis pela produção de frutos no próximo ano. Esta fase ocorre durante os meses de dias longos (setembro a março) do primeiro ano do ciclo fenológico, e prepara a planta fisiologicamente para a safra do ano seguinte. A segunda fase é caracterizada pela indução das gemas axilares (vegetativas), formadas na primeira fase, para gemas florais e seu desenvolvimento até o abotoamento, esta fase acontece durante o período de dias curtos (abril a agosto) e fecha o primeiro ano fenológico do cafeeiro. No fim desta fase (julho-agosto) as plantas entram em um período de repouso (dormência), preparatório para o florescimento. O segundo ano fisiológico se inicia com a florada (setembro a dezembro), após ocorrência de chuva ou irrigação, posteriormente ocorre a granação dos frutos (janeiro a março), e maturação

dos frutos (abril e junho). Na última fase (julho a agosto) os ramos entram em um período de repouso, senescência e queda (CAMARGO, A. D., & CAMARGO, 2001).

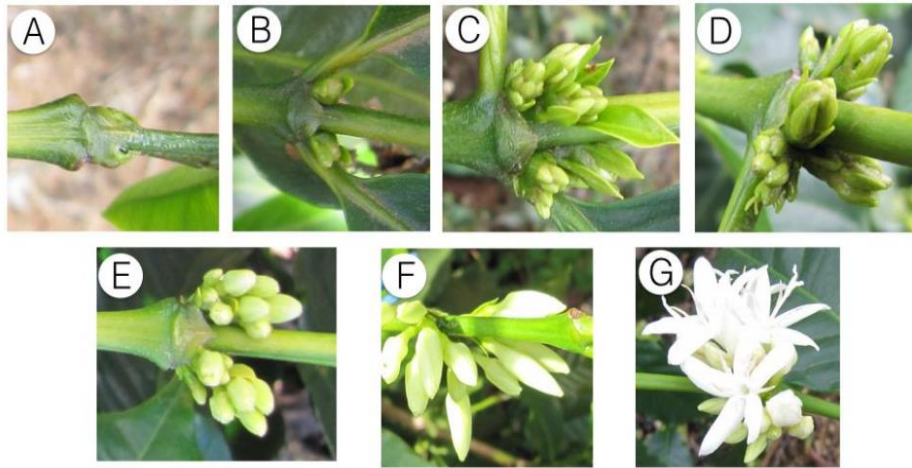
Figura1- Esquemática das seis fases fenológicas do cafeeiro arábica, durante 24 meses, nas condições climáticas tropicais do Brasil

1º ANO FENOLÓGICO												2º ANO FENOLÓGICO											
1ª FASE			2ª FASE			3ª FASE			4ª FASE			5ª FASE			6ª FASE								
VEGETAÇÃO E FORMAÇÃO DAS GEMAS VEGETATIVAS			INDUÇÃO E MATURAÇÃO DAS GEMAS FLORAIS			FLORADA (APÓS UMIDADE)			GRANAÇÃO DOS FRUTOS			MATURAÇÃO DOS FRUTOS			REPOUSO E SENESCÊNCIA DOS RAMOS TERCIÁRIOS E QUARTENÁRIOS								
DIAS LONGOS			DIAS CURTOS			CHUMBINHO E EXPANSÃO DOS FRUTOS																	
← 7 MESES →			← ETP = 350 mm →																				
SECA: AFETA GEMAS E PRODUÇÃO DO ANO SEGUINTE			FOLHAS PEQUENAS			SECA: PENEIRA BAIXA			SECA: CHOCHAMENTO			SECA: BOA BEBIDA											
SET	OUT	NOV	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO
← PERÍODO VEGETATIVO →							REPOUSO		← PERÍODO REPRODUTIVO →							AUTO-PODA							
												NOVO PERÍODO VEGETATIVO											

Fonte: CAMARGO, A. D., & CAMARGO (2001).

A fase reprodutiva do cafeeiro foi dividida em quatro grandes fases (Figura 2): desenvolvimento da gema floral (G), floração (FL), frutificação (F) e maturação (M). A fase de desenvolvimento da gema foi subdividida de acordo com o seu tamanho, onde G1 - refere-se aos nós com gemas indiferenciadas; G2 – nós com gemas intumescidas; G3 – gemas com até 3 mm de comprimento; G4 – gemas medindo 3,1 a 6 mm de comprimento; G5 – gemas de 6,1 a 10 mm (coloração verde claro). No estágio G6 (gema maior que 10 mm e coloração branca), ocorre a abertura das flores (FL) logo nas primeiras horas da manhã, as quais murcham no segundo dia e caem no terceiro (MORAIS et al.,2008).

Figura 2 - Escala detalhada das fases de desenvolvimento floral de *Coffea arábica*.

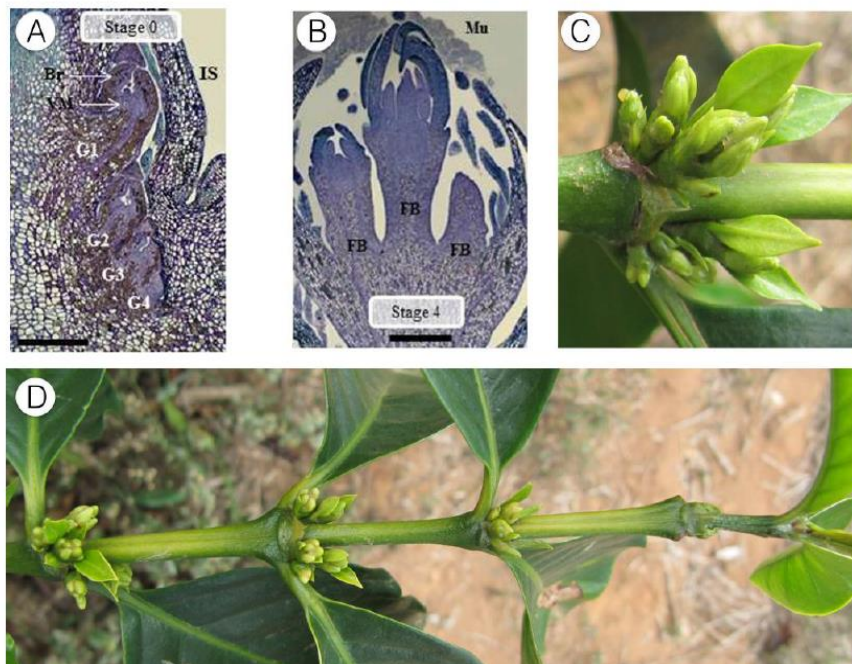


Legenda: Desenvolvimento de flores de café. (A) Gemas indiferenciadas (estágio G1). (B) Nós com gemas intumescidas (estágio G2). (C) Botões florais com até 3 mm de Comprimento (fase G3). (D) Botões florais que variam de 3,1 a 6 mm de comprimento (G4) etapa. (E) Botões florais de 6,1 a 10 mm de comprimento (verde claro (Fase G5)). (F) Botões florais maiores que 10 mm de comprimento (branco Cor) (fase G6). (G) Antese.

Fonte: LIMA(2015).

O florescimento do cafeeiro é dividido em quatro fases sequenciais: indução floral, diferenciação floral, dormência e antese (RENA et al., 1986). Após as gema atingirem o estágio G4 de desenvolvimento, as gemas entram em um período de dormência, no qual podem permanecer por várias semanas (BARROS,1978). Após a dormência das gemas serem quebradas ocorre o florescimento de forma gregária, ou seja, todas as plantas florescem ao mesmo tempo em uma determinada região, sendo o número de floradas variável, desde poucas, como ocorre no Brasil, até várias ao longo do ano, como ocorre na Colômbia (SOARES et al., 2005). Um dos fatores que contribuem para o comportamento floral irregular nesta espécie é o desenvolvimento assíncrono dos botões florais desde o início de sua formação (Figura 3) (DE OLIVEIRA et al., 2014). A falta de sincronia ocasiona maturação desuniforme dos frutos, sendo possível observar em uma mesma planta e ramos com flores, frutos verdes e maduros (CRISOSTO et al.,1992; RODRIGUES SOARES et al., 2005). Este hábito reprodutivo leva a dificuldades relacionadas com colheitas parciais, controle de doenças, controle de pragas, redução na qualidade dos grãos e aumento nos custos da colheita (DAMATTA, 2007).

Figura 3 - Diferentes níveis de assicronia de desenvolvimento de gemas encontradas em cafeeiros.



Legenda: (A) Análise anatômica de quatro brotos vegetativos (G1-G4). (B) inflorescência com três brotos de flores representados (DE OLIVEIRA et al., 2014). (C) Inflorescências em diferentes estádios de desenvolvimento no mesmo nó. (D) Gradiente de desenvolvimento de botões florais ao longo de um ramo plagiotrópico.(Br)brácteas. (VM) meristema vegetativo. estipulas interpetiolares(IS). brotos florais (FB). mucilagem (Mu).

Fonte : DE OLIVEIRA et al, (2014), LIMA (2015)

2.3 Influência do Déficit Hídrico sobre o Florescimento do Cafeeiro

A deficiência hídrica acentuada e prolongada pode impactar negativamente o ciclo de vida e a produtividade do cafeeiro, sendo este efeito intensificado quando associado com altas temperaturas. Contudo, em níveis moderados, a restrição hídrica nas semanas que antecedem a florada torna-se uma condição necessária para promover a concentração do florescimento (ALVIM,1960; CAMARGO, 2001; DAMATTA, 2006). Cafeeiros hidratados constantemente ou afetados por chuvas esporádicas apresentam diversas floradas com intensidade variável, enquanto que, cafeeiros reidratados somente após um período seco apresentam floradas mais uniformes (RENA; MAESTRI, 1985).

Alguns trabalhos demonstram a importância do período de seca para quebrar a dormência das gemas florais do cafeeiro. Em um trabalho realizado na região costeira do Peru, onde raramente chove, foi verificado que nos cafeeiros constantemente irrigados não houve abertura dos botões florais, ao contrário dos cafeeiros submetidos ao déficit hídrico (ALVIM, 1973). Crisosto et al. (1992) verificaram que as plantas irrigadas continuamente não

apresentaram antese, pois os botões mantiveram-se no estágio G4, indicando que sem um déficit de água não ocorre o progresso da gema para as fases seguintes (CRISOSTO et al.,1992). Quanto às plantas mantidas sobre seca, também não foi constatada antese, sugerindo que a reidratação é um componente obrigatório para conclusão do desenvolvimento floral do cafeeiro (CRISOSTO et al.,1992). Assim, observa-se que a água possui efeito estimulador, uma vez que, a quebra da dormência é induzida pelas chuvas ou irrigação ao promover o aumento substancial no teor de água das gemas dormentes.

Em cafeeiros cultivados sob déficit hídrico o florescimento foi estimulado quando as folhas apresentaram potencial hídrico foliar abaixo de $-0,8$ MPa, ou quando foi imposto déficit hídrico mais ameno ($-0,3$ a $-0,5$ MPa) por um período mais prolongado, cerca de duas semanas (CRISOSTO et al.,1992). Da mesma forma cafeeiros submetidos à restrição hídrica por cerca de 70 dias, com potencial hídrico foliar de $-2,0$ MPa apresentaram antese cerca de 12 dias após o retorno da irrigação, culminando em florada única e uniforme com cerca de 80% de frutos no estágio cereja, ideal para colheita (GUERRA et al., 2005).

O aumento do potencial hídrico da planta resulta na absorção de água pelas folhas, desencadeando um rápido influxo para os botões florais (ALVIM, 1973; BROWNING, 1977; MAGALHÃES; ANGELOCCI, 1976). É possível que a água carregue substâncias da dentro da gema do cafeeiro induzindo a quebra da dormência, uma vez que foi proposto por CRISOSTO et al. (1992) que a reidratação provoca o transporte de substâncias da raiz para a parte aérea tornando as gemas florais competentes e induzindo a antese. A entrada de água provoca o intumescimento das gemas, as quais retomam o crescimento até atingirem cerca de 12 mm, adquirindo o formato de “pinha”(LIVRAMENTO, 2010). Considera-se que entre 10 e 35 mm de chuva são suficientes para estimular a florada, de modo que o excesso hídrico afeta negativamente a formação dos botões (PEREIRA et al., 2008).

Embora o aumento do potencial hídrico seja um fator essencial para estimular o florescimento, este estímulo só é eficaz se a gema estiver no estágio G4 de desenvolvimento (CRISOSTO et al.,1992). Nesta fase as gemas se tornam sensíveis a responder estímulos e retomar o crescimento, sendo a antese iniciada logo após as primeiras chuvas da estação (MES, 1957; RENA, A.B.; MAESTRI, 1985). Foi proposto por Crisosto et.al. (1992) que a quebra da dormência ocorre devido a modificações na sinalização da raiz com a parte aérea durante o período de deficiência hídrica e após o aumento do potencial hídrico, sugerindo que alguns mensageiros químicos, como os fitormônios, seriam capazes de tornar os botões florais aptos para antese, estimulando a floração no cafeeiro. Dessa forma, é possível que a capacidade de interagir com sinais endógenos e exógenos no estágio G4 esteja associada com o

desenvolvimento do xilema secundário. Gemas em fases anteriores a G4 apresentam pouca quantidade de xilema secundário, e essa restrição anatômica limita a comunicação dessas gemas com estímulos emitidos pela raiz durante ou após um período de déficit hídrico (ALVIM, 1960; CRISOSTO et al., 1992).

2.4 Regulação Hormonal Sob Déficit Hídrico

O déficit hídrico e estresse abiótico que mais afeta a produtividade das culturas, podendo ser comparado com a soma de todos os outros fatores (SAINI; WESTGATE 1999). As plantas que enfrentam condições de déficit de água sofrem alterações em uma série de processos nos níveis fisiológicos, bioquímicos e moleculares, como a fotossíntese, a absorção de nutrientes e as modificações na expressão gênica, o que pode levar a uma parada do crescimento e redução do rendimento (FAROOQ et al., 2009).

Os hormônios desempenham um papel crucial na adaptação das plantas a vários estresses ambientais (PELEG e BLUMWALD, 2011). Em geral, acredita-se que o ácido abscísico (ABA) e etileno são os dois hormônios principais que ligam as respostas das mesmas ao estresse (ALBACETE et al., 2014; DOLFERUS, 2014).

O ácido abscísico (ABA) reduz o turgor das células-guarda, induzindo o fechamento estomático, limitando a perda de água e a assimilação de carbono pela fotossíntese (MARRACCINI et al., 2011). Como a assimilação de carbono é a etapa inicial da inativação de reações de transferência de elétrons, nas plantas estressadas há uma redução de energia, diminuindo o oxigênio molecular e aumentando o número de moléculas reativas de oxigênio que causam danos foto-oxidativos (PRAXEDES et al., 2006). Em consequência, há aumento na atividade das enzimas antioxidantes, bem como nos teores de ascorbato e hidroascorbato, atuando na detoxificação dos radicais livres formados em função do estresse (DEUNER et al., 2011).

As vias de transdução do ABA estão diretamente associadas ao gene *RD29* (Responsive to Desiccation), que está relacionado à resposta ao estresse de por seca, frio e alta salinidade. Na planta este gene é importante, pois codifica para proteínas hidrofílicas, ajudando as plantas a suportar as condições ambientais desfavoráveis (JIA et al., 2012). Este gene se destaca na resposta ao estresse, pois apresenta em sua região promotora dois elementos cis-acting um conhecido como ABRE (ABAResponsive Element) e DRE (Dehydration-Responsive Element). Dessa forma permite a ação de fatores de transcrição das vias de transdução ABA-dependente e ABA-independente (YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2006; SHINOZAKI, 1994).

O déficit hídrico é um dos fatores associados ao aumento na taxa de produção do etileno (WANG, 2002), entretanto, em alguns casos o déficit hídrico pode reprimir a produção de etileno (SOBEIH et al., 2004). Plantas de trigo e de tomate apresentaram redução da produção de etileno na parte aérea após passarem por um período de déficit hídrico (NARAYANA, 1991; MORGAN et al., 1990). Aparentemente, as plantas expostas à secagem suave do solo (em que ψ_{folha} é mantido, ou diminui muito lentamente) apresentam uma estimulação da síntese de etileno, enquanto que as plantas com déficit de água foliar apresentam uma supressão da síntese de etileno.

A reidratação têm sido associada um rápido e substancial aumento na produção de etileno e ao transporte de seu precursor (ACC) para a parte aérea (GOMEZ-CADENAS et al., 1996; LIU et al., 2013; TUDELA; PRIMO-MILLO, 1992). Em plantas de trigo e em rosas, foi observado um rápido aumento da produção de etileno após a reidratação (BALOTA et al., 2004; BELTRANO et al., 1997; MENG et al., 2014). No cafeeiro foi observado aumento na expressão dos genes de biossíntese do etileno poucas horas após a reidratação (LIMA, 2015).

2.5 Etileno na Regulação do Florescimento

A relação do etileno com o florescimento já foi analisada em algumas espécies, entretanto, sua ação ainda permanece em discussão. Em algumas espécies Oe etileno estimula o florescimento, como no caso abacaxi que tem o florescimento estimulado pelo etileno (MENG et al., 2014), e das rosas que tem a abertura floral induzida pelo etileno (TRUSOV, 2006) e em outros demonstrou ser inibidor como no caso da Arabidopsis e do arroz (ACHARD et al., 2007; WANG Q. et al., 2013). No abacaxi, o florescimento é associado a uma pequena explosão da produção de etileno no meristema em resposta a sinais ambientais (TRUSOV, 2006). Em rosas a reidratação induz um rápido e transitório aumento da produção de etileno nas flores, este aumento funciona como um sinal para garantir a recuperação de água nas flores, promovendo assim a abertura floral (MENG et al., 2014).

No cafeeiro, a antese também parece estar relacionada com etileno. Plantas de café tratadas com o inibidor da ação do etileno 1-metilciclopropeno (1-MCP) apresentaram abertura floral, e os dados de expressão dos genes de biossíntese e sinalização do etileno indicam que a ligação do 1-MCP bloqueou os receptores do etileno, cessando os sinais que eram enviados para reduzir a síntese, e a planta foi estimulada a produzir mais etileno, elevando a sensibilidade da planta ao hormônio (LIMA, 2015; SANTOS, 2016). Além disso, foi observado que a reidratação provocou aumento na expressão dos genes da biossíntese e sinalização do etileno

poucas após a reidratação, sendo proposto que existe uma conexão entre o etileno e a promoção do florescimento no cafeeiro (LIMA,2015).

A elevação no nível de etileno em plantas podem resultar do transporte de ACC a partir das raízes (GOMEZ-CADENAS et al., 1996; TUDELA; PRIMO-MILLO, 1992), Desta forma foi sugerido que o cafeeiro acumula o precursor do etileno (ACC) na raiz durante o período de déficit hídrico e após a reidratação o mesmo é transportado para a parte aérea onde seria convertido em etileno (LIMA, 2015).

2.6 Influência do Etileno e do déficit hídrico sobre o Desenvolvimento do Sistema

Vascular

Os hormônios controlam a diferenciação e o crescimento cambial através de uma rede regulatória complexa. O câmbio vascular é o meristema que produz xilema e floema secundários por divisão celular periclinal (LOVE, 2009). O etileno parece estar diretamente envolvido no desenvolvimento do cambio vascular, sendo que em alguns casos o etileno parece inibir o desenvolvimento vascular e em outros estimular. Em tomate níveis elevados de etileno demonstraram inibir a diferenciação do xilema (ZOBEL; ROBERTS, 1978). Neste trabalho a podridão final da flor (BER) foi utilizado como um indicador de limitações no transporte de cálcio e, portanto, fornecendo assim um método indireto para avaliação da conexão do xilema. Foi observado que as plantas que passaram por um período de déficit hídrico apresentaram alguma proteção contra BER, indicando a presença de uma conexão de xilema mais estabelecida provavelmente pela redução nos níveis de etileno na parte aérea(ZOBEL; ROBERTS, 1978). Entretanto alguns trabalhos relatam que o etileno pode estimular o crescimento cambial tanto em árvores quanto em espécies herbáceas (BIRO et al., 1980; GARTNER,1995). Em *Populus* o etileno demonstrou influenciar diretamente a divisão celular cambial, sendo observado que a aplicação do precursor imediato do etileno (ACC) no meio de cultura estimulou o crescimento do xilema (LOVE, 2009).

Embora existam vários relatos da importância do etileno no desenvolvimento vascular, é possível que ocorra uma interação do etileno com outros hormônios (LOVE,2009), isto porque o sinal desencadeado por um único hormônio pode ser melhorado ou reduzido por outras moléculas (SORCE et al.,2013). Além do etileno, tanto a auxina quanto as giberelinas (GAs) são estimuladores conhecidos da divisão celular cambial (UGGLA, 1998; BJORKLUND ,2007).

Diversos estudos demonstram uma interação do etileno com as giberelinas e com a auxina. Em arroz, foi observado que após a submersão das plantas houve indução na produção

de etileno que resultou na inibição da biossíntese de ácido abscísico que, por sua vez, levou a uma estimulação da biossíntese de giberelinas (KENDE,1998; VOESENEK, 2006). Em raízes de *Arabidopsis*, a biossíntese de auxina foi induzida pelo etileno (STEPANOVA et al., 2007, RUZICKA K, et al. 2007), já em *Populus* a biossíntese de etileno foi estimulada pela auxina (SWARUP et al., 2007; RUZICKA et al., 2007).

Portanto, existem evidências de que os hormônios podem interagir na regulação da atividade cambial, mas esta interação parece ser complexa e ainda precisa ser elucidada. Dessa forma, trabalhos devem ser feitos para alcançar uma melhor compreensão do *crosstalk* hormonal operando no controle do desenvolvimento do sistema vascular.

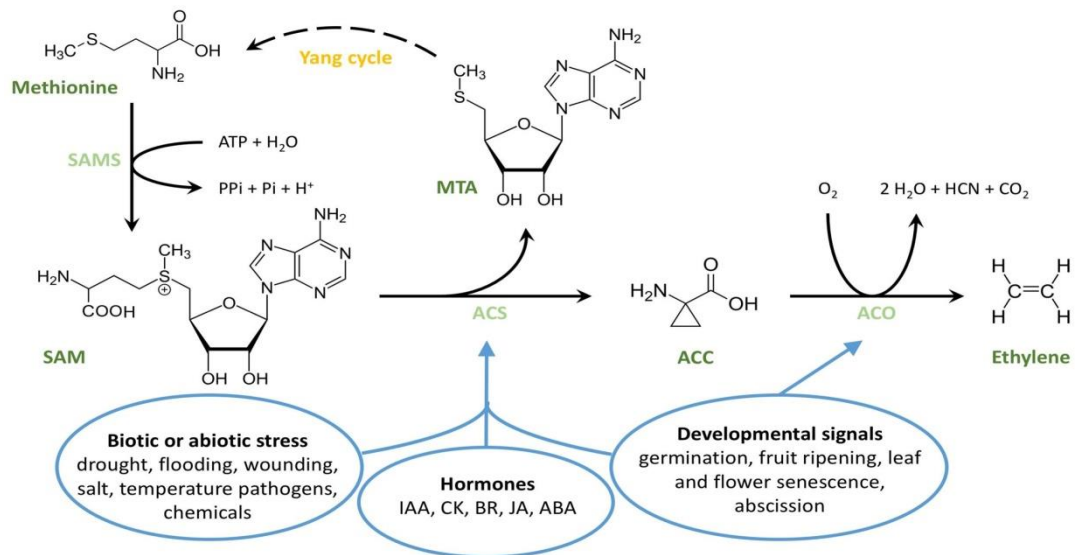
Com relação ao desenvolvimento do sistema vascular, existem evidências que o períodos de déficit hídrico provoca alteração no sistema vascular. Plantas cultivadas sob déficit hídrico apresentam elementos de vaso menores, mais agrupados e mais numerosos (Costa et al., 2004). Em caules de milho (Abd El-Rahim et al., 1998) e videira (Lovisololo & Schubert, 1998), a baixa disponibilidade de água na raiz resultou em elementos de xilema de menor diâmetro. Em *Astragalus gombiformis* Pomel o déficit hídrico provocou um menor diâmetro do vaso do xilema (BOUGHALLEB et al., 2014), e em *Raphanus sativus* L. o estresse hídrico causou uma redução significativa na área do feixe vascular da folha e na espessura da nervura central da folha (AKRAM, , 2016). No cafeeiro a influência do déficit hídrico sobre o desenvolvimento do sistema vascular ainda não está elucidado.

2.7 Síntese e Sinalização do Etileno

O etileno é um hormônio gasoso composto por dois átomos de carbono e quatro átomos de hidrogênio (C_2H_4) sendo produzido na maioria dos tecidos vegetais e tipos de células (ABELES, 1992;WANG, 2002). Apesar da sua estrutura simples de dois carbonos, o etileno é um potente modulador do crescimento e desenvolvimento das plantas (ECKER, 1995). Os níveis de biossíntese de etileno em toda a planta são relativamente baixos durante o desenvolvimento vegetativo, mas são aumentados em resposta a uma ampla variedade de condições de desenvolvimento, bem como por vários sinais hormonais e ambientais (Figura 4). O etileno regula muitos aspectos do ciclo de vida da planta, incluindo germinação de sementes, iniciação de raiz, desenvolvimento radicular, desenvolvimento de flores, determinação do sexo, amadurecimento de frutos, senescência e respostas a fatores bióticos e abióticos (ZHEFENG, 2009). Sua produção é rigorosamente regulada por sinais internos durante o desenvolvimento e em resposta a estímulos ambientais de ataques bióticos e estresses abióticos, como ferimentos, hipoxia, refrigeração ou congelamento (WANG, 2002).

A síntese do etileno ocorre a partir do aminoácido metionina. A metionina dá origem ao etileno através de três reações enzimáticas chave: (i) a metionina é convertida em S-AdoMet por S-AdoMet sintetase; (ii) ACC Sintase (ACS) converte S-AdoMet para ACC; e (iii) a ACC oxidase (ACO) degrada ACC para produzir o etileno. Esta reação é dependente de oxigênio, sendo que em condições anaeróbicas, a formação de etileno é completamente suprimida (LIN, 2009). A enzima ACC sintase também produz 5'-metiltioadenosina (MTA) nesta reação, que é então convertida em metionina usando um ciclo de metionina modificado. Outra importante reação é o chamado ciclo de Yang, que recupera o enxofre e ressynetiza o SAM.

Figura 4 - Rota biossintética do etileno e ciclo de Yang.



Legenda: (SAM)S-adenosil- L- metionina , (SAMS) SAM-sintase, (ACC) ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico; (MTA) 5'-metiltioadenosina, (ACS) ACC sintase, (ACO) ACC oxidase.

Fonte: VANDERSTRAETEN (2017).

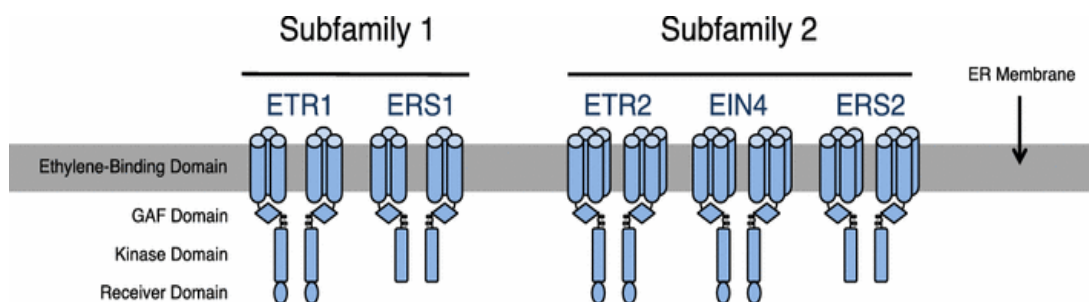
Após a sua síntese, o etileno é percebido e seu sinal transduzido para desencadear respostas biológicas específicas (WANG, 2002). Na maioria dos casos, a percepção do sinal ocorre na superfície da membrana plasmática ou no núcleo (CHEN et al., 2005). Em *Arabidopsis* o etileno é percebido por uma família de cinco receptores ligados à membrana (ETR1, ETR2, ERS1, ERS2, EIN4) os quais apresentam similaridade com os reguladores de dois componentes de bactérias (BLEECKER, 1999).

Em *Arabidopsis*, de acordo com as similaridades estruturais, os receptores podem ser divididos em duas subfamílias (Figura 5): a subfamília *ETR1-like* e a subfamília *ETR2-like*. A subfamília *ETR1-like*, composta por ETR1 e ERS1, é caracterizada por apresentar três domínios transmembrana na porção N-terminal e um domínio conservado de histidina quinase na porção

C-terminal. A subfamília *ETR2-like*, que inclui ETR2, EIN4 e ERS2, possui um quarto domínio transmembrana na porção N-terminal e um domínio histidina quinase degenerado na região C-terminal, faltando um ou mais elementos considerados necessários para atividade histidina quinase. Além disso, um membro de cada subfamília, ERS1 e ERS2, não apresentam o domínio receptor na porção C-terminal de suas proteínas, domínio este característico nos outros membros destas subfamílias (HUA et al., 1998).

Os receptores estão localizados em todos os tecidos da planta, de modo que qualquer órgão é responsivo ao etileno (BARRY; GIOVANNONI, 2007), ainda que a resposta e sensibilidade sejam dependentes da espécie, estágio de desenvolvimento da planta e capacidade de percepção do órgão (CIARDI; KLEE, 2001; JONES et al., 2001), a qual é regulada de acordo com o nível de receptores.

Figura 5: Arquitetura dos cinco receptores de etileno encontrados em *Arabidopsis*. Os receptores se agrupam em duas subfamílias que diferem na composição do domínio e atividade quinasa



Legenda: *ETR1* (Ethylene Receptor 1), *ERS1* (Ethylene Response Sensor1), *ERS2* (Ethylene Response Sensor2) e *EIN4* (Ethylene Insensitive 4) e *ETR2* (Ethylene Receptor 2)

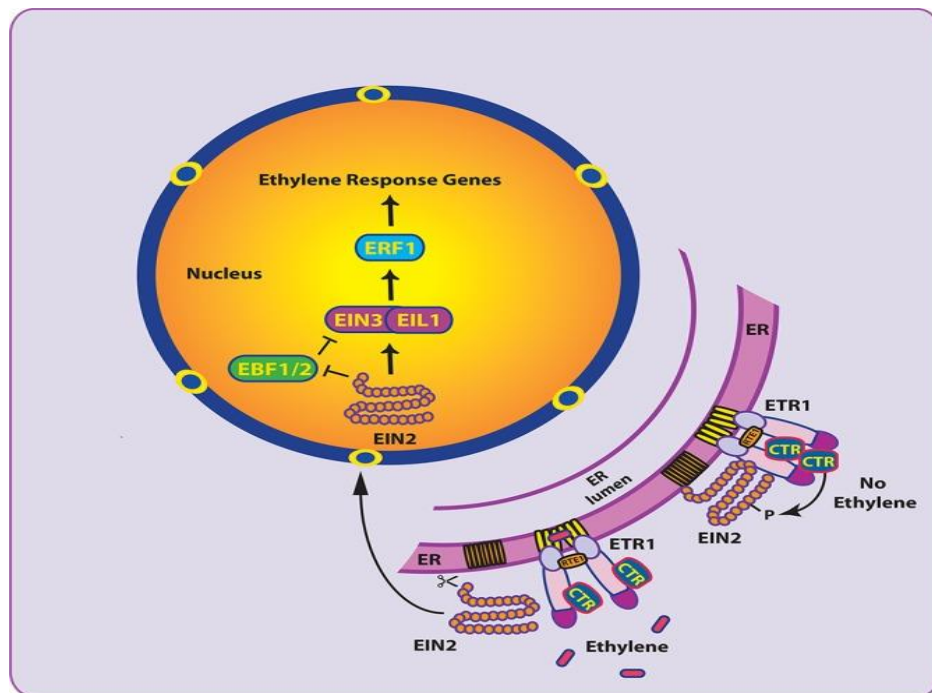
Fonte: LIGHT (2016).

Os receptores se ligam ao etileno através do seu domínio N-terminal, que está localizado no retículo endoplasmático (O'MALLEY, 2005). Na ausência de etileno os receptores ativam a atividade quinase de CTR1 suprimindo a resposta ao etileno de modo que EIN2 e os fatores de transcrição EIN3 / EIL permanecem inativos (Figura 6). Na presença de etileno os receptores não mais ativam a CTR1 e, portanto, a CTR1 não mais suprime a via, permitindo a ativação de EIN2, e a indução da cascata transducional e o estabelecimento de respostas de etileno (CHEN et al., 2005).

A cascata de transdução de sinal segue com a ativação de EIN3 (ALONSO et al., 1999; STEPANOVA et al., 2007). EIN3 são fatores de transcrição localizados no núcleo das células

e ligam-se a genes que possuem uma região denominada de elemento primário de resposta ao etileno (PERE). A sequência PERE foi encontrada no promotor do gene ERF1 (*Ethylene Response Factor 1*), o qual pertence à família dos genes ERFs. Essa sequência está presente em uma grande família de fatores de transcrição conhecidas como proteínas de ligação de elementos em resposta ao etileno (EREBPs) (SOLANO et al., 1998). Os ERFs ligam-se especificamente a região *GCC box*, motivos de DNA altamente conservados presentes em muitos genes associados com a expressão de respostas ao etileno (DAVIES, 2004; HAO et al., 1998).

Figura 6- Estrutura básica da rota de sinalização do etileno demonstrando seu funcionamento na presença e na ausência de etileno.



Legenda: Na ausência do etileno o complexo de receptores de etileno/CTR1 está no seu modo ativo impedindo a ativação dos componentes subsequentes da rota. A ligação do etileno a este complexo promove a sua inativação, permitindo a ativação dos componentes subsequentes da rota, e consequentemente, às respostas ao etileno.

Fonte: GALLIE (2015).

2.8 Transporte do ACC a Longa Distância

Além da biossíntese, conjugação e catabolismo de um hormônio, o transporte de curto ou longo alcance é outro aspecto importante para regular a dosagem adequada de um sinal hormonal dentro de um organismo. Muitas vezes, os hormônios são sintetizados em um local e transportados para outro local onde ocorre a resposta fisiológica. (VAN DE POEL, 2014). A resposta do etileno a longa distância pode ser alcançada pelo transporte do seu precursor (ACC)

(MCMANUS, 2012). Uma oferta equilibrada e consumo de ACC é essencial para alcançar o nível de produção necessário de etileno dentro de um determinado contexto espacial e temporal (VAN DE POEL, 2014).

Aparentemente, o ACC pode ser transportado da raiz para a parte aérea através do xilema ou floema (ZHANG & DAVIES, 1989; TUDELA E PRIMO-MILLO, 1992). O transporte via floema foi comprovado ao aplicar ACC radioativo em folhas de algodão. A radioatividade total foi medida ao longo do tempo no caule, no hipocótilo e no ápice da plantas, sendo os padrões de radioatividade foram consistentes com o transporte via floema do ACC radioativo (AMRHEIN et al., 1982). O transporte via xilema foi demonstrado em plantas de tomate inundados. Nessas plantas a falta de oxigênio na raiz estimulou a produção de ACC na raiz, entretanto o excesso de ACC nas raízes não foi convertido em etileno por falta de oxigênio e ausência de ACO nas raízes. Desta forma o ACC foi carregado no xilema e transportado para a parte aérea (BRADFORD et al., 1982 ; WANG E ARTECA, 1992;ENGLISH et al., 1995).

O transporte a longa distância do ACC também parece ocorrer durante períodos de déficit hídrico (SOBEIH et al., 2004 ; SKIRYCH et al., 2011) e após a reidratação (TUDELA et al., 1992;GÓMEZ-CADENAS et al., 1996). Em *Cleopatra mandarin* foi observado que o estresse hídrico provocou acúmulo de ABA (24 vezes) e ACC (16 vezes) nas raízes das plantas e que após a reidratação os níveis de ABA e ACC voltaram ao nível normal na raiz e aumentaram respectivamente 10 e 17 vezes nas folhas (GÓMEZ-CADENAS, 1996). Em outro trabalho com a mesma espécie (*Cleopatra mandarin*) foi observado que houve uma alta acumulação de ACC e um aumento da atividade da ACC Sintase na raiz da plantas sob estresse hídrico e que a reidratação provocou aumento acentuado no conteúdo de ACC e na produção de etileno em folhas das plantas que estavam sob estresse hídrico, sendo que o conteúdo de ACC no líquido de xilema foi 10 vezes maior após a reidratação nas plantas que estavam sob estresse do que as plantas irrigadas (TUDELA et al., 1992).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local e período experimental

O experimento foi conduzido no Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, MG – Brasil, no período de julho a agosto de 2017. As análises foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas (Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia) e no Laboratório de Anatomia Vegetal (Departamento de Biologia) da Universidade Federal de Lavras.

3.2 Material Vegetal e Delineamento Experimental

Para a realização deste experimento, foram utilizadas mudas de *Coffea arabica* cultivar Catuaí Vermelho IAC 144. Inicialmente as sementes foram semeadas em sacos de polietileno em casa de vegetação, onde permaneceram por dois anos. Posteriormente, as mudas foram transplantadas para vasos de vinte litros de capacidade e transferidas para uma estufa com exaustor (Figura 7), onde permaneceram por dois meses até o fim do experimento.

Figura 7- Estufa onde o experimento foi conduzido durante dois meses. As mudas foram cultivadas em vasos de vinte litros de capacidade.



Fonte: Avelar (2018)

3.3 Instalação do Experimento

No momento do transplante para os vasos de vinte litros todos os vasos foram pesados, para padronizar o peso dos vasos em 20 Kg. Duas semanas após o transplante os vasos foram saturados com água e deixados para drenar por 24 h até atingirem a capacidade de campo. O potencial hídrico foliar foi medido a cada quinze dias até as folhas atingirem potencial hídrico foliar desejado. A determinação dos valores do potencial hídrico das mudas sob déficit hídrico foi feito de forma visual, de tal forma que no tratamento com estresse hídrico intenso o potencial hídrico foi estabelecido quando as mudas apresentaram sinais de déficit hídrico (murcha foliar intensa), e no tratamento com estresse hídrico moderado quando as mudas começaram a apresentar murcha foliar. Os valores do potencial hídrico dos tratamentos 1,2 e 3 foram -1,2MPa, -0,4MPa e -0,25 MPa respectivamente (Tabela1). As mudas foram mantidas nestes potenciais hídricos por dois meses. Para manter o potencia hídrico das folhas os vasos foram

pesados a cada três dias, sendo repostos somente a água perdida pela evapotranspiração. Para o cálculo da perda de água dos vasos foi considerada a diferença de peso de cada vaso no dia em questão e o peso do dia anterior (LAGO et al., 2012; BOLZA et al., 2008). Além disso, após a instalação do experimento o potencial hídrico foliar foi medido a cada quinze dias. Após dois meses as mudas foram reidratadas e foram coletadas folhas e raízes nos tempos 0,3,6 e 24 horas após a reidratação para realização das análises moleculares.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com três tratamentos com vinte repetições cada, totalizando sessenta plantas no total.

Tabela 1- Tratamentos aplicados às mudas de *Coffea arabica* da cultivar Catuaí 144 durante o experimento.

Tratamento	Potencial hídrico foliar
T1	-1,2 MPa
T2	-0,4 MPa
T3	-0,25 MPa

Fonte: Avelar (2018).

3.4 Análises Fisiológicas

3.4.1 Potencial Hídrico Foliar

O estado hídrico das plantas foi avaliado com frequência quinzenal, por meio de medidas do potencial hídrico de base (Ψ_w máximo), realizadas com auxílio de uma Câmara de Scholander em folhas do terceiro ou quarto nó, totalmente expandidas, na antemanhã. As avaliações foram realizadas em cinco plantas (repetições) por coleta, sorteadas na área experimental, sendo que em cada medida foram usadas mudas diferentes das usadas na medida anterior.

3.5 Análises Moleculares

3.5.1 Coleta do Material

A coleta das folhas e raízes foi realizada antes da reidratação e após 3,6 e 24 horas após a reidratação. Foram coletadas folhas completamente expandidas localizadas no 3º e 4º nós do ramos plagiotrópicos e as raízes das plantas. O material coletado foi mantido em nitrogênio líquido, e em seguida armazenado em freezer -80°C até o momento das análises.

3.5.2 Extração de RNA

As folhas e raízes foram maceradas em crisol utilizando nitrogênio líquido, armazenando-se 100mg (0,25ml) de material vegetal para extração de RNA em tubos tipo eppendorf de 1,5ml. Para extração, foi utilizado o Protocolo do Concert™ (Plant RNA Purification Reagent - Invitrogen, USA).

Adicionou-se 600 µL de Concert ao material macerado, o tubo com o material foi levado ao agitador para homogeneização por 2 minutos. Os tubos foram deixados na posição horizontal por 10 minutos à temperatura ambiente e posteriormente centrifugados a 14.800 g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, foram coletado 650 µL do sobrenadante o qual foi transferido para um novo tubo. Foi adicionado 100 µL de NaCl 5M e 300 µL de clorofórmio, o tubo foi levado ao agitador por 1 minuto e centrifugado a 14.800 g por 10 minutos a 4°C. Novamente foi coletado 550 µL do sobrenadante e transferido para um novo tubo. Mais uma vez 100 µL de NaCl 5M e 300 µL de clorofórmio foram adicionados, repetindo-se as etapas da homogeneização em agitador e centrifugação citadas anteriormente. Posteriormente foi coletado 350 µL do sobrenadante o qual foi transferido para um novo tubo. Foi adicionado isopropanol na mesma proporção Volume/Volume ao sobrenadante. As amostras foram homogeneizadas por 15 inversões, em seguida, os tubos foram armazenados em freezer -20°C durante 1 hora para precipitação do RNA.

Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 14.800 g por 25 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 600 µL de etanol 75% foram adicionados e as amostras foram centrifugadas a 14.800 rpm por 5 minutos a 4°C. O etanol foi descartado cuidadosamente e os tubos foram deixados abertos até o etanol secar completamente. Após a secagem, o RNA foi ressuscitado com 20 µL de água miliQ autoclavada. As amostras foram estocadas em freezer -20°C até a realização das análises. Após a extração do RNA, as amostras foram analisadas quanto à quantidade e qualidade utilizando-se um espectrofotômetro Nanovue® (NanoVue GE Healthcare). Foram utilizados 1,5 µL de cada amostra para realizar essa análise, observando-se a concentração do RNA e as relações de pureza A260\280 e A260\230, priorizando, preferencialmente, valores entre 1,8 a 2,2. Para avaliar a integridade do RNA extraído, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* e visualizado em fotodocumentador UV-transilluminator (UVITEC FireReader XS D-77Ls- 20. M).

3.5.3 Tratamento com DNase

As amostras foram tratadas com o *Turbo DNA free™ kit* (Ambion) para eliminação do DNA residual. Em tubos de 0,5 mL, 5 µg de RNA (a ser tratado) foi utilizado, completando-se o volume final para 22 µL com água comercial livre de RNase e demais contaminantes. O mix (tampão + DNase) foi preparado para um volume de reação de 25 µL, contendo 0.1 volume (2,5 µL) de *10x Turbo DNase Buffer* e 0.1 volume (5 µL) de *Turbo DNase*. 3 µL do mix foram adicionados em cada amostra e homogeneizados delicadamente sendo, em seguida, incubado em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, 0.1 volume (2,5 µL) de *DNase Inactivation reagent* foram adicionado em cada amostra e as mesmas foram homogeneizadas, mantendo-se por 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 2 minutos. Foram coletado cuidadosamente, 18 µL do sobrenadante e transferidos para novos tubos de 0,2 mL. Um volume de 1,5 µL do RNA tratado foi utilizado para quantificação no Nanovue®. Para avaliar a integridade e pureza do RNA, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* e visualizado em fotodocumentador UV-transilluminator (UVITEC FireReader XS D-77Ls-20.M), armazenadas posteriormente em freezer -20°C.

3.5.4 Síntese de cDNA

Após a extração do RNA e do seu tratamento com DNase, as amostras que apresentaram alto grau de integridade e pureza foram utilizadas para a síntese de cDNA. Para isto foi utilizando o Kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Em tubos de 0,2 mL foi adicionado 1 µg de RNA tratado, este volume foi completado com água comercial livre de RNase e demais contaminantes até o volume de 10 µL. Foram adicionado em cada reação 10 µL do mix, contendo 2 µl de 10X Reverse Transcriptase Buffer, 2 µL de 10x RT random primers, 0.8 µL de dNTP mix, 1 µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase e 4.2 µL de água livre de DNase e RNase). Em seguida as amostras foram delicadamente homogeneizadas e transferidas para o termociclador (Multigene Gradient – Labnet), onde ocorreu a síntese do cDNA. A reação ocorreu com as seguintes condições de ciclagem: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C e 5 minutos a 85°C, sendo as amostras armazenadas em freezer -20°C.

3.5.5 Análise da expressão gênica por RT- qPCR

A análise da expressão dos genes relacionados com a síntese *CaACO1-like* (Nº acesso KF975695), *CaACS1 like* (Nº acesso KF975694) e sinalização do etileno *CaETR4-like*(Nº

acesso KF975698) e o gene indicador de estresse *CcRD29* (Nº acesso GT660256) foram conduzidas utilizando-se o termociclador Rotor-Gene Q Real-Time PCR (Qiagen), utilizando o sistema de detecção SYBR® Green. O volume final da reação para cada amostra foi de 15 µL: 7,5 µL de SYBR Green (QuantiFast SYBR Green PCR Kit – Qiagen), 0,6 µL de *primers* específicos para cada gene alvo (0,3 µL primer *forward* + 0,3 µL primer *reverse*), 1,5 µL de cDNA na concentração de 10 ng\µL e 5,4 µL de água livre de RNase e demais contaminantes.

Foram utilizadas três repetições biológicas de cada tratamento para cada um dos tempos analisados (0, 3, 6 e 24hs), sendo utilizadas triplicadas técnicas para cada uma das amostras. As seguintes condições de ciclagem foram utilizadas: 5 min a 95 °C para ativação da enzima, seguidos de 40 ciclos de 5 s a 95 °C e 10 s a 60 °C, e completado com uma curva de *melting* para se avaliar a especificidade da reação, aumentando-se a temperatura de 60 °C para 95 °C, com o aumento de 1 °C a cada 5 s. A eficiência de amplificação dos *primers* dos genes alvos e de referência foi determinada por meio de curva de diluição (Tabela 2). A análise da expressão relativa foi calculada através do método $\Delta\Delta CT$, de acordo com (PFAFFL ,2001), utilizando os genes de referência *AP47*(Nº acesso DV690764.1) e *PP2A*(Nº acesso GT005097.1) (FERNANDES-BRUM et al, 2017). A diferença relativa da expressão de cada gene foi realizada com base em uma amostra calibradora, que foi escolhida de acordo com o menor nível de expressão para cada um dos genes nos tecidos analisados.

Tabela 2: Sequência de *primers* e eficiência da amplificação por RT-qPCR

GENE	SEQUÊNCIA DO <i>PRIMER</i>	Eficiência de amplificação
<i>CaACO1 – like F</i>	ACGTGGAAGCCAATGTTACC	96
<i>CaACO1 – like R</i>	CGCAACTGTTTGAGATCACG	

<i>CaACS1 - like F</i>	TCCTTACCATCCCACCAGAA	90
<i>CaACS1 - like R</i>	CCATGAATTTGTTTCGCTCCT	
<i>CaETR4 - like F</i>	TTGGTCCATTCAGGAACTCG	85
<i>CaETR4 - like R</i>	GCATCCTGTTTTGCTTGTTG	
<i>CcRD29 F</i>	TGATGATCAAGATCCCCAACAC	94
<i>CcRD29 R</i>	CTTCGCTTTCGCCTTCACTT	
<i>AP47 F</i>	GGTGTACGCTCACCATTTTCATC	99
<i>AP47 R</i>	AGCCAACAGCACCAGTAACTTG	
<i>RPL39 F</i>	GCGAAGAAGCAGAGGCAGAA	87
<i>RPL39 R</i>	TTGGCATTGTAGCGGATGGT	

3.6 Análises Anatômicas

Para realizar as análises anatômicas foram coletadas folhas jovens que se desenvolveram durante o período de déficit hídrico. Foram utilizados nove repetições por tratamento totalizando vinte e sete amostras no total. As amostras foram fixadas em FAA por 72 horas, o FAA é uma solução fixadora composta por Formaldeído 37% (50 ml), Etanol 70% (50 mL) e Ácido Acético Glacial (900 mL). Posteriormente as amostras foram transferidas para frascos com álcool 70 % e desidratadas em uma sequência de diferentes concentrações de álcool (70, 80, 90 e 100%), e foram deixadas por 15 minutos em vácuo e duas horas em cada concentração alcoólica, posteriormente as amostras foram deixadas por 24 horas em solução de resina para pré-infiltração composta de etanol 100% e resina líquida base (1:1), depois foi realizado o emblocamento (Figura 8) com o *kit HistoResin* (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha). As secções foram feitos em micrótomo semi automático rotativo com espessura de 5 µm de espessura e corados com azul de toluidina (O'BRIEN, 1994) tampão acetato 0,1 M, pH 4,7, e lavados com água destilada para retirar o excesso de corante, posteriormente as lâminas foram montadas com Verniz vitral como meio de montagem. As lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópios de luz que possui uma câmera acoplada ao computador onde foram armazenadas e salvas em CD. Foi utilizado o software *Image Tool*, versão 3.0 (University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, EUA) para medir a área do floema, e do xilema e número de elementos de vasos de xilema.

Figura 8- Blocos de historesina contendo fragmentos de folhas de *Coffea arabica*



Fonte: Avelar (2018).

3.6.1 Análises Estatísticas

Para a análise anatômica quantitativa, foram realizadas quatro medições em cada repetição, a média de cada repetição foi utilizada para realizar as análises estatísticas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a significância estatística dos resultados foi analisada pelo Teste F, sendo as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

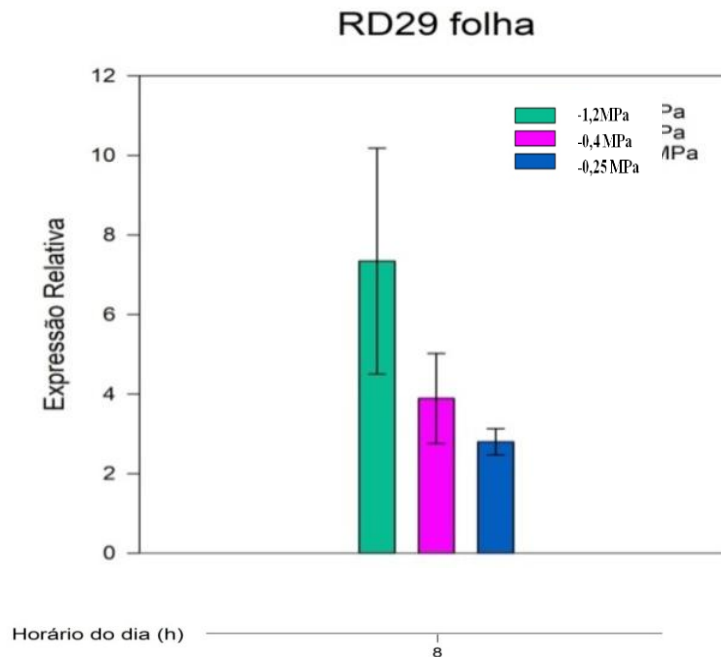
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Expressão Gênica

O gene *CcRD29* foi diferencialmente expresso nas folhas (Figura 9). Nas mudas com potencial hídrico foliar de -1,2 MPa o gene *CcRD29* foi três vezes mais expresso do que nas mudas com potencial hídrico foliar de -0,25MPa (Figura 9). Não houve diferença de expressão entre as mudas com potencial hídrico foliar de -0,25MPa e as mudas com potencial hídrico foliar de -0,4 MPa.

O gene *CcRD29* está relacionado à resposta ao estresse de por seca, frio e alta salinidade. Na planta, este gene codifica para proteínas hidrofílicas, ajudando assim às plantas suportarem as condições ambientais desfavoráveis (JIA et al., 2012). Com base nos resultados de expressão deste gene, pode-se dizer que as mudas com potencial hídrico foliar de -1,2 MPa estavam em uma condição de déficit hídrico e que as mudas com -0,25MPa estavam bem hidratadas, além disso, as mudas com potencial hídrico foliar de -0,4 MPa também estavam bem hidratadas, uma vez que não houve diferença de expressão do gene *CcRD29* deste tratamento com as mudas com potencial hídrico foliar de -0,25MPa.

Figura 9- Expressão gênica relativa do gene *CcRD29* em folhas de *Coffea arabica* antes de serem reidratadas.



Legenda: Expressão relativa realizada com base em uma amostra calibradora, escolhida de acordo com o menor nível de expressão para cada um dos genes nos tecidos analisados. Mudanças com -1,2 MPa estavam em uma condição de estresse e as mudanças com -0,4 e -0,25 não estavam em uma condição de estresse. A expressão foi analisada antes da reidratação das mudanças.

Fonte: Avelar(2018)

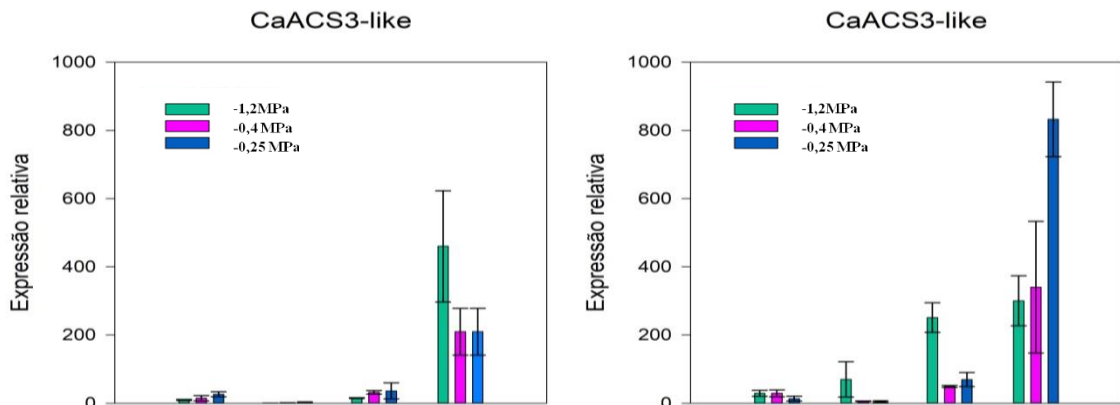
Antes das mudanças serem reidratadas, os genes *CaACSI-like* e *CaACO1-like* foram duas vezes mais expressos nas folhas das mudanças irrigadas do que nas mudanças cultivadas sob estresse intenso (Figura 10). Na raiz, antes da reidratação não houve diferença de expressão do gene *CaACO1-like*, e o gene *CaACSI-like* foi duas vezes mais expresso nas mudanças cultivadas sob estresse intenso do que nas mudanças irrigadas. Não houve diferença de expressão do gene *CaETR4-like* nas folhas e nas raízes antes da reidratação das mudanças.

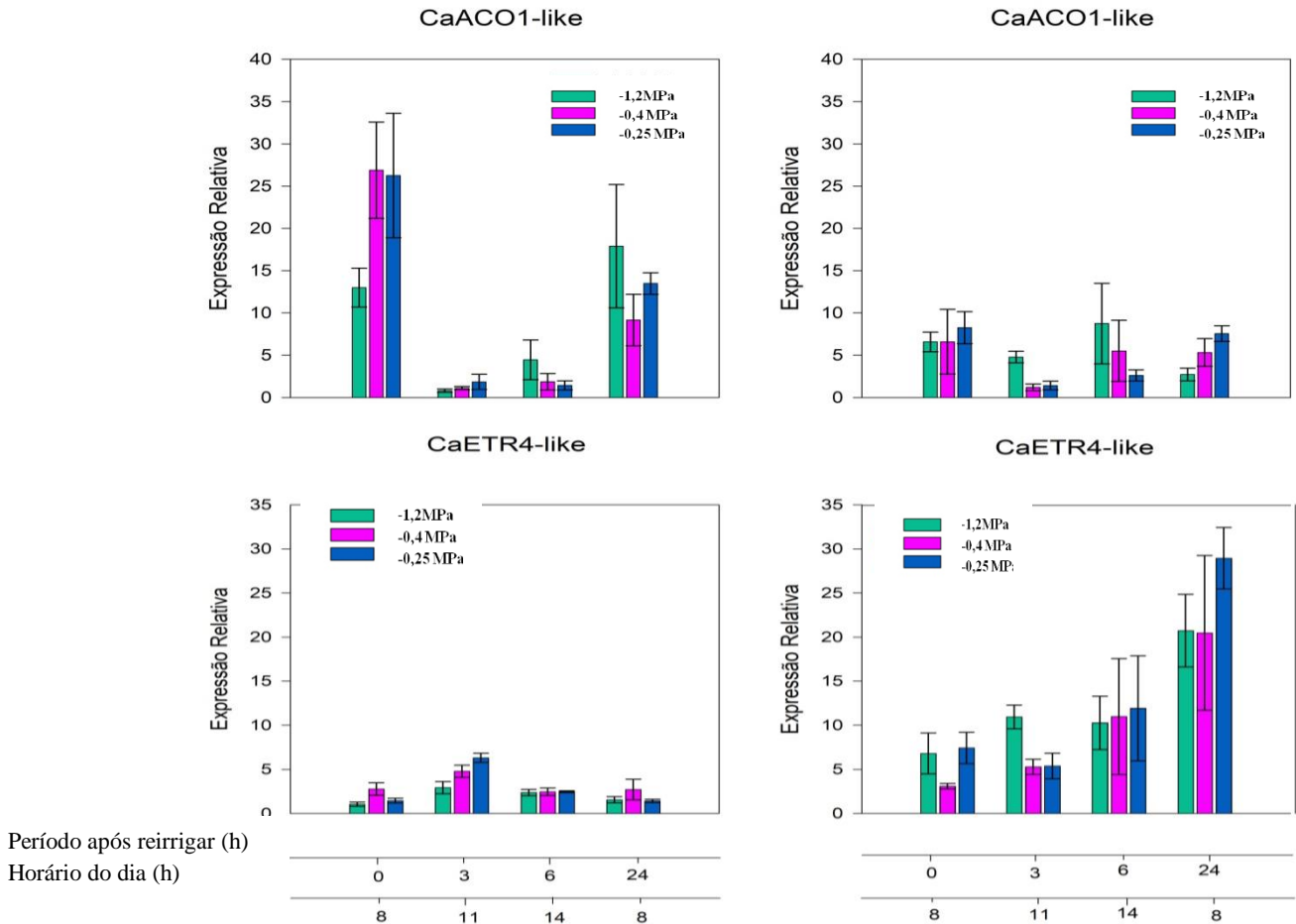
O perfil de expressão dos genes *CaACSI-like* e *CaACO1-like* indicam que, antes da reidratação houve uma maior produção de etileno nas folhas das mudanças cultivadas sob estresse intenso do que as mudanças irrigadas. Alguns trabalhos relatam que a produção do etileno está diretamente relacionada à intensidade do estresse hídrico e à velocidade na qual foi estabelecido. Em tomate, o estresse hídrico moderado (ψ_{folha} -0,32 MPa a -0,45 MPa) estimulou a produção de etileno nas folhas, já o estresse severo inibiu sua produção em tomate (ψ_{folha} -0,4 MPa a -1,3 MPa) e em algodão (ψ_{folha} -1,4 a -1,6 MPa) (KALANTARI *et al.*, 2000; MORGAN, 1990). Aparentemente, as plantas expostas à secagem suave do solo (em que ψ_{folha} é

mantida, ou diminui muito lentamente) apresentam uma estimulação da síntese de etileno, enquanto as plantas com déficit de água foliar apresentam uma supressão da síntese de etileno (SOBEIH, et al.,2004).

Nas raízes, a maior expressão do gene *CaACS1-like* nas mudas cultivadas sob estresse intenso indica que as mesmas estavam produzindo mais ACC na raiz do que as mudas irrigadas. Como a expressão do gene *CaACS1-like* manteve-se constante, provavelmente não houve mudança na produção de etileno na raiz, indicando que o ACC excedente poderia estar sendo acumulado no sistema radicular. Mudanças de *Cleopatra Mandarin* cultivadas sob déficit hídrico apresentaram 16 vezes mais ACC na raiz do que as mudas irrigadas. No café, ainda não foi quantificado o ACC na raiz de plantas sob déficit hídrico, entretanto, o perfil de expressão dos genes de biossíntese e sinalização do etileno sugerem que durante o déficit hídrico o café acumula o precursor do etileno (ACC) no sistema radicular (LIMA, 2015).

Figura 10- Expressão gênica relativa dos genes *CaACS1-like*, *CaACO1-like* e *CaETR4-like* em folhas e raízes de mudas de *Coffea arabica* mantidas com potenciais hídricos foliares de -1,2MPa, -0,4MPa e -0,25 MPa.





Legenda: Expressão relativa realizada com base em uma amostra calibradora, escolhida de acordo com o menor nível de expressão para cada um dos genes nos tecidos analisados. Painel à esquerda: perfil de expressão dos genes *CaACS1-like*, *CaACO1-like* e *CaETR4-like* em folhas. Painel à direita: perfil de expressão dos genes *CaACS1-like*, *CaACO1-like* e *CaETR4-like* em raízes. A expressão dos genes e folhas raízes foi avaliada nos tempos: 0, 3, 6 e 24 horas após a reidratação das mudas.

Três horas após as mudas serem reidratadas, houve redução da expressão dos genes *CaACS1-like* e *CaACO1-like* e aumento na expressão do gene *CaETR4-like* nas folhas de todos os tratamentos (Figura 10). Nas folhas, três horas após a reidratação o gene *CaACS1-like* foi quatro vezes mais expresso e o gene *CaACO1-like* foi duas vezes mais expresso nas mudas irrigadas do que nas mudas cultivadas sob estresse intenso respectivamente, já o gene *CaETR4-like* três horas após a reidratação, foi duas vezes mais expresso nas folhas das mudas irrigadas do que nas mudas que estavam sob estresse intenso. Nas raízes, três horas após a reidratação houve redução da expressão dos genes *CaACS1-like* e *CaACO1-like* nas raízes das mudas irrigadas, já nas raízes das mudas cultivadas sob estresse intenso houve aumento na expressão do gene *CaACS1-like* e a expressão do gene *CaACO1-like* manteve-se constante. Três horas após a reidratação, o gene *CaACS3-like* foi cinco vezes mais expresso e o gene *CaACO1-like*

foi três vezes mais expresso nas raízes das mudas cultivadas sob estresse intenso do que as mudas irrigadas.

Seis horas após a reidratação, houve um aumento na expressão dos genes *CaACSI-like* e *CaACO1-like* nas folhas de todos os tratamentos, sendo que o gene *CaACSI-like* foi duas vezes mais expresso nas folhas das mudas irrigadas do que as mudas cultivadas sob estresse intenso, já o gene *CaACO1-like* foi duas vezes mais expresso nas folhas das mudas cultivadas sob estresse intenso do que nas mudas irrigadas (Figura 10). Após seis horas da reidratação, o gene *CaETR4-like* apresentou redução da expressão nas mudas irrigadas, entretanto, não houve diferença de expressão do gene *CaETR4-like* entre os tratamentos. Seis horas após a reidratação, nas raízes houve aumento da expressão dos genes *CaACSI-like* e *CaACO1-like* em todos os tratamentos. Os genes *CaACSI-like* e *CaACO1-like* foram aproximadamente quatro vezes mais expressos nas raízes das mudas cultivadas sob estresse intenso do que nas mudas irrigadas. O gene *CaETR4-like* apresentou aumento da expressão nas mudas irrigadas, entretanto, que não houve diferença de expressão do gene *CaETR4-like* entre os tratamentos (Figura 10).

Após a reidratação, houve uma grande redução da expressão dos genes de biossíntese do etileno nas folhas, sugerindo que houve uma grande redução na produção de etileno na parte aérea após a reidratação. Entretanto trabalhos relatam aumento na produção de etileno nas folhas após reidratação. Em plantas de trigo e em rosas L. foi observado um rápido aumento da produção de etileno após a reidratação (BALOTA et al., 2004; BELTRANO et al., 1997; MENG et al., 2014), assim como no cafeeiro, que foi observado aumento na expressão dos genes de biossíntese do etileno após a reidratação (LIMA, 2015). Este resultado contraditório pode estar relacionado à aplicação de excesso de água no momento da reidratação, de tal forma que, que pode ter ocorrido falta de oxigênio no solo. A falta de oxigênio pode ter reduzido temporariamente a produção de ACC nas raízes acarretando na redução da produção de ACC. A maior expressão do gene *CaACSI-like* observada na raiz das mudas sob estresse intenso três horas após a reidratação, pode estar relacionada a presença de oxigênio nas raízes destas mudas mesmo após a reidratação. Após seis horas, houve aumento da expressão do gene *CaACO1-like* nas folhas das mudas sob estresse, indicando que houve aumento na produção de etileno, é possível que o ACC tenha sido transportado da raiz para a parte aérea, proporcionando o aumento na produção de etileno, uma vez que após seis horas houve um aumento na expressão do gene *CaACSI-like* nas raízes das mudas cultivadas sob estresse.

Vinte e quatro horas após a reidratação, houve aumento da expressão dos genes *CaACSI-like* e *CaACO1-like* nas folhas de todos os tratamentos (Figura 10). O gene *CaACSI-like* foi duas vezes mais expresso nas folhas das mudas cultivadas sob estresse intenso do que

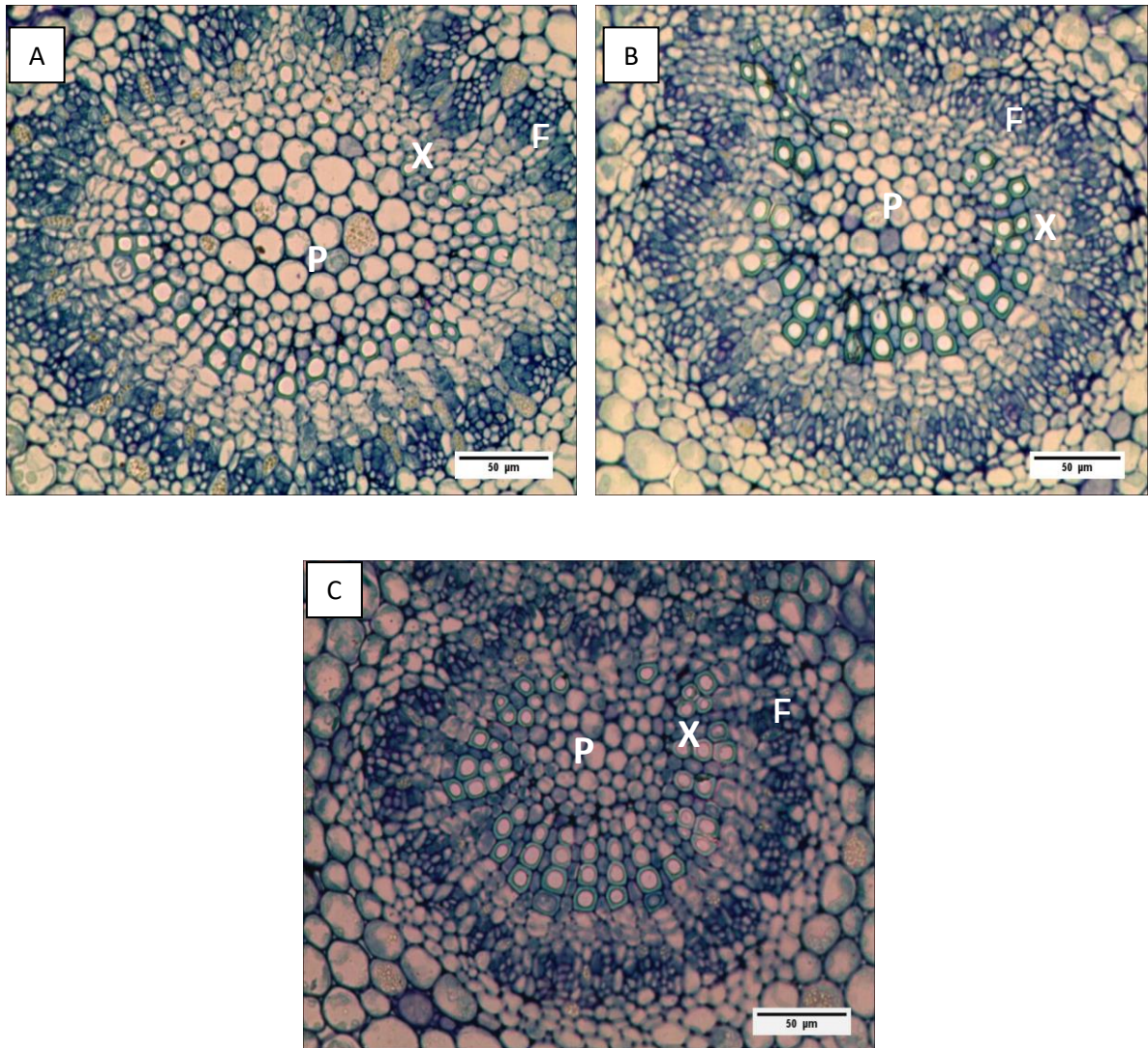
nas mudas irrigadas (Figura 10). O gene *CaACO1-like* apresentou aumento da expressão nas folhas de todos tratamentos, entretanto não houve diferença de expressão entre os tratamentos. Na raiz vinte e quatro horas após a reidratação, a expressão do gene *CaACSI-like* aumentou nas mudas irrigadas e permaneceu constante nas mudas cultivadas sob estresse intenso, sendo o gene *CaACSI-like* duas vezes mais expresso nas raízes das mudas irrigadas do que nas cultivadas sob estresse intenso. O gene *CaACO1-like* apresentou redução da expressão nas mudas cultivadas sob estresse intenso e aumento nas mudas irrigadas, sendo o gene *CaACO1-like* três vezes mais expresso nas raízes das mudas irrigadas do que nas mudas cultivadas sob estresse intenso. Na raiz houve aumento na expressão do gene *CaETR4-like* nas mudas irrigadas, entretanto não houve diferença de expressão entre os tratamentos (Figura 10).

O aumento de expressão do gene *CaACO1-like* observado após vinte e quatro horas, pode estar relacionado ao ciclo natural de produção de etileno pelas plantas, uma vez que a expressão observada vinte e quatro horas após a reidratação foi igual a do dia anterior, assim como a expressão do gene *CaETR4-like*. Aparentemente, as plantas aumentam a produção de etileno até o meio do dia e depois reduzem a produção até o meio da noite (THAIN, 2004).

4.2 Análises Anatômicas

Nas secções transversais das folhas de café (Figura 11) foi medido a área do floema e do xilema e número de vasos de xilema.

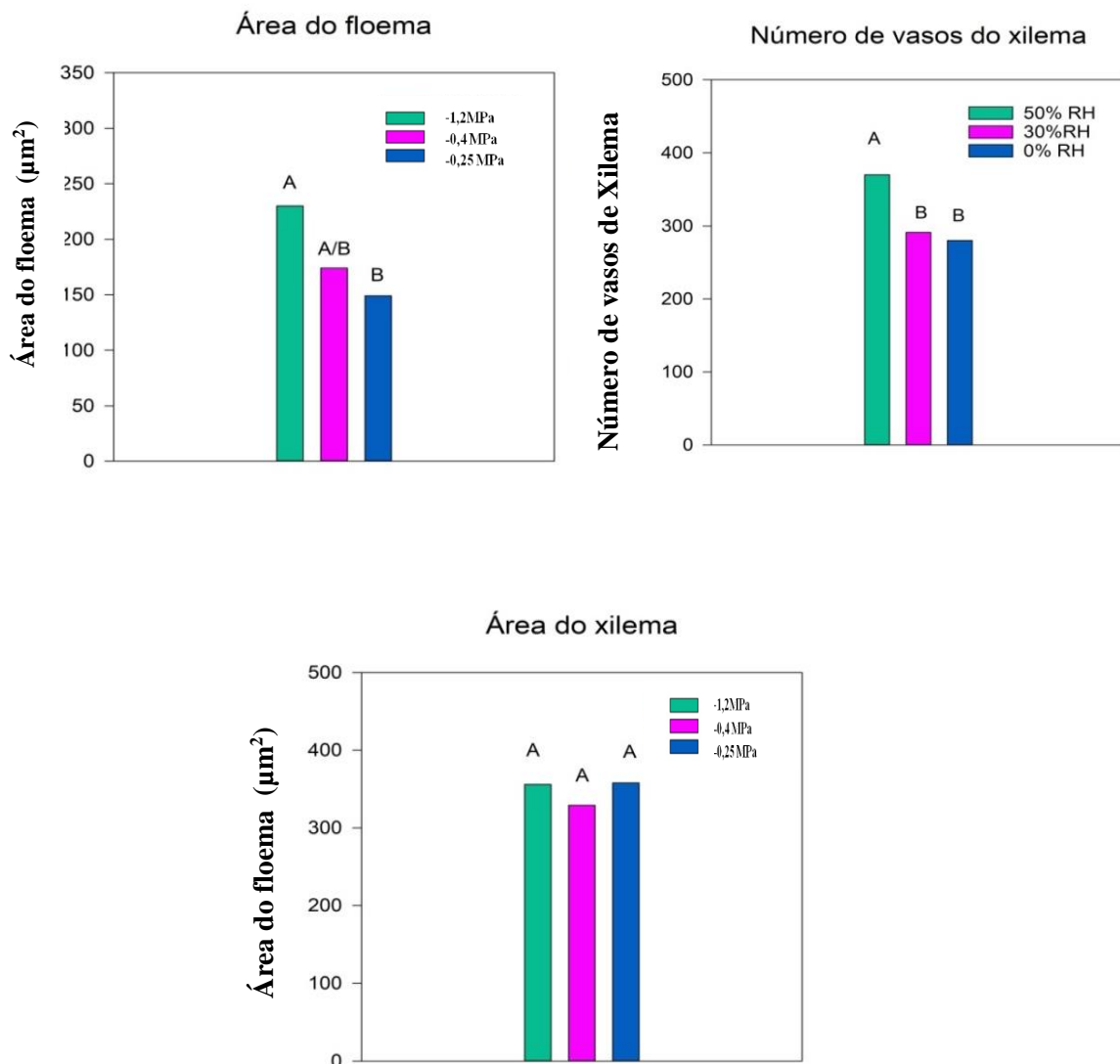
Figura 11: Secções transversais em folhas jovens de café



Legenda: a) folhas de mudas com potencial hídrico foliar de $-1,2\text{MPa}$, b)folhas de mudas com potencial hídrico foliar de $-0,4\text{MPa}$, c) folhas de mudas com potencial hídrico foliar de $-0,25\text{MPa}$. (X) xilema, (F) floema,(P) parênquima fundamental .
 Fonte: Avelar (2018)

De acordo com os resultados houve diferença significativa na área do floema (CV 8,43 %) e no número de elementos de vasos do xilema (CV 12,5%) nas folhas das mudas do cafeeiro pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As mudas cultivadas sob estresse intenso apresentaram maior área do floema e maior número de vasos do xilema do que as mudas irrigadas.

Figura 12 - Área do floema, número de vasos do xilema, área do xilema em folhas de *Coffea arabica* cultivas sob déficit hídrico



Legenda: Área do floema (A), número de vasos do xilema(B) área do xilema(C). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Neste trabalho, foram utilizadas folhas jovens para fazer cortes anatômicos, uma vez que as mudas não possuíam gemas. Não é possível afirmar com certeza que o mesmo comportamento ocorre em outros tecidos, inclusive no pedúnculo das gemas, uma vez que nas mesmas não há câmbio vascular e sim o procâmbio que dá origem ao sistema vascular primário, entretanto se o déficit hídrico provocar efeitos semelhantes no pedúnculo das gemas é possível que isso provoque uma melhor conexão entre a gema e o ramo. Uma melhor conexão pode influenciar o fluxo de substâncias para dentro do fruto, uma vez que o número, diâmetro e comprimento dos vasos do xilema, influenciam na condutividade hidráulica na rota ramo-fruto (TYERMAN et al., 2004). Além disto, uma melhor conexão pode permitir um maior fluxo de sinais químicos da raiz para a gema, uma vez que conexões restritas do xilema podem limitar o

fluxo de diferentes sinais químicos a longa distância na planta, influenciando na sensibilidade dos órgãos aos sinais radiculares (DAVIES, 2000). Diversos estudos demonstram que o precursor do etileno (ACC) pode funcionar como um sinal radicular a longa distância, através do xilema e do floema, resultando em respostas do etileno em longa distância (ZHANG & DAVIES, 1989; TUDELA e PRIMO-MILLO, 1992; AMRHEIN et al. 1982). Desta forma, uma melhor conexão pode permitir um maior fluxo de substâncias da raiz para dentro botões florais, inclusive o etileno.

Além de influenciar o transporte de ACC, a maior área do floema também pode influenciar no transporte de água para dentro do fruto, uma vez que em espécies durante a maturação dos frutos entrada de água pode ser influenciada, sendo que grande parte da água entra no fruto pelo floema. Em tomate, foi verificado que durante o desenvolvimento do fruto, 90% de toda água que entra no fruto é via floema e que a água importada via xilema cessa quase completamente aproximadamente 20 dias após a antese (EHRET & HO, 1986; HO et al., 1987). Da mesma forma, em videira foi observado uma rápida troca de fluxo, predominantemente pelo xilema, mudando para um maior fluxo pelo floema próximo ao início da maturação (GREENSPAN et al., 1994) e um fluxo predominantemente do floema após a maturação (LANG & THORPE, 1989; ROGIERS et al., 2001).

O maior número de vasos de xilema nas mudas sob estresse pode estar relacionado ao menor nível de etileno nestas plantas, uma vez que os níveis elevados de etileno demonstraram inibir a diferenciação do xilema (ZOBEL; ROBERTS, 1978). Em um trabalho realizado com tomate foi sugerido que em plantas irrigadas os níveis elevados de etileno podem inibir o desenvolvimento do xilema (DAVIES et al., 2000). Neste trabalho, a podridão final da flor (BER) foi utilizado como um indicador de limitações no transporte de cálcio e portanto, fornecendo assim um método indireto para avaliação da conexão do xilema. Foi observado que as plantas que passaram por um período de déficit hídrico apresentaram alguma proteção contra BER, indicando a presença de uma conexão de xilema mais estabelecida provavelmente pela redução nos níveis de etileno na parte aérea.

Além disso, o aumento do número de vasos do xilema e maior área do floema podem estar relacionados a uma interação entre auxina e etileno. A auxina é essencial para a diferenciação do xilema (BISHOPP et al., 2011; FABREGAS et al 2015; FUKUDA et al., 1980) e do floema (ALONI, 1979). A inibição da diferenciação do xilema pode estar associada a mudanças nos níveis de auxina e no transporte de auxina polar, que são ambos regulado pelo etileno (SWARUP et al., 2007; RUZICKA et al., 2007). Trabalhos relatam que o etileno estimula a produção de auxina (SWARUP, 2007; RŮŽIČKA, 2007) e aumenta a quantidade de

transportadores da auxina PIN3 e PIN7 evitando o acúmulo de auxina localizada (LEWIS, 2011). Assim, os níveis aumentados de etileno em plantas de café em condições bem irrigadas podem evitar o acúmulo de auxina influenciando diretamente no desenvolvimento do xilema e do floema.

5 CONCLUSÕES

- O estresse hídrico provocou maior expressão do gene CaACS3-like na raiz.

- A reidratação das mudas de café provocou uma redução da expressão dos genes de biossíntese de etileno seguido de um aumento na expressão dos genes de biossíntese e sinalização do etileno nas folhas.
- As mudas cultivadas sob estresse apresentaram maior número de vasos de xilema e maior área do floema nas folhas jovens que cresceram durante o período de estresse hídrico.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado nos valores de expressão dos genes *CaACS3-like*, *CaACO1-like* e *CaETR4-like* nas folhas e raízes sugere-se que o estresse hídrico provoca um aumento na produção de

ACC nas raízes e reduz a produção de etileno na parte aérea, e que a reidratação provoca uma redução na produção de etileno na parte aérea seguido de um aumento 6 horas após a reidratação. Estes resultados podem dar suporte a trabalhos futuros que visem compreender a influência do etileno no florescimento.

Os dados de anatomia indicam que o déficit hídrico provoca aumento no número de vasos de xilema e área do floema em folhas jovens. Trabalhos futuros podem ser feitos a fim de avaliar se o déficit hídrico provoca alterações na formação do sistema vascular no pedúnculo do fruto. Estes conhecimentos poderão ajudar a compreender a influência do sistema vascular no transporte de sinais químicos da raiz para a gema do cafeeiro.

7. REFERENCIAL TEÓRICO

ABELES, F. B.; MORGAN, P. W.; SALTVEIT, J.R. **Ethylene in plant biology**. 2. ed. London:

Academic press., 414p., 1992.

ACHARD, P. et al. The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 15, p. 6484–9, 10 abr. 2007.

AKRAM, Nudrat Aisha et al. Alterações anatômicas induzidas pela seca em folhas de rabanete (*Raphanus sativus* L.) fornecidas com trealose através de diferentes modos. **Arid Land Research and Management** , v. 30, n. 4, p. 412-420, 2016.

ALBACETE, Alfonso et al. Hormonal and metabolic regulation of tomato fruit sink activity and yield under salinity. **Journal of experimental botany**, v. 65, n. 20, p. 6081-6095, 2014.

ALONI, Roni. Role of auxin and gibberellin in differentiation of primary phloem fibers. **Plant Physiology**, v. 63, n. 4, p. 609-614, 1979.

ALONSO, J. M. et al. EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. **Science**, 284, 2148–2152, 1999

ALVES, J. D. Morfologia do Cafeeiro. In: CARVALHO, C. H. S. (Ed.). **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília: Embrapa Café, 334p, 2008.

ALVIM, P. D. T. Moisture Stress as a Requirement for Flowering of Coffee. **Science**, v. 132, n. 3423, p. 354–354, 5 ago. 1960.

ALVIM, P. DE T. Factors Affecting Flowering of Coffee. In: **Genes, Enzymes, and Populations**. Boston, MA: Springer US, 1973. p. 193–202.

AMRHEIN, N. et al. The metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. **Plant growth substances**, v. 1982, p. 249-258, 1982.

BALOTA, MARIA et al. Ethylene production of two wheat cultivars exposed to desiccation, heat, and paraquat-induced oxidation. **Crop science**, v. 44, n. 3, p. 812-818, 2004.

BARROS, R. S.; MAESTRI, M.; COONS, M. P. The physiology of flowering in coffee: a review. **Journal of coffee research**, v. 8, n. 2-3, p. 29-73, 1978.

BARRY, C. S.; GIOVANNONI, J. J. Ethylene and fruit ripening. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 26, n. 2, p. 143-159, Jun. 2007.

BELTRANO, J. et al. Emission of water stress ethylene in wheat (*Triticuma estivum* L.) ears: effects of rewatering. **Plant Growth Regulation**, p. 121-126, 1997.

BIRO, RL et al. Thigmomorphogenesis: mudanças na divisão celular e alongamento nos internodos de plantas de feijão mecanicamente perturbadas ou tratadas com etrel. **Annals of Botany** , v. 45, n. 6, p. 655-664, 1980.

BISHOPP, Anthony et al. Phloem-transported cytokinin regulates polar auxin transport and maintains vascular pattern in the root meristem. **Current Biology**, v. 21, n. 11, p. 927-932, 2011..

BOUGHALLEB, Fayçal et al. Anatomical adaptations of *Astragalus gombiformis* Pomel. under drought stress. **Open Life Sciences**, v. 9, n. 12, p. 1215-1225, 2014.

BJÖRKLUND, Simon et al. Cross-talk between gibberellin and auxin in development of *Populus* wood: gibberellin stimulates polar auxin transport and has a common transcriptome with auxin. **The Plant Journal**, v. 52, n. 3, p. 499-511, 2007.

BLEECKER, A. B.; KENDE, H. Ethylene: A gaseous signal molecule in plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 16, p. 1-18, 2000

BRADFORD, Kent J.; HSIAO, Theodore C.; YANG, Shang Fa. Inhibition of ethylene synthesis in tomato plants subjected to anaerobic root stress. **Plant Physiology**, v. 70, n. 5, p. 1503-1507, 1982.

BROWING, G. Environmental control of flower bud development in *Coffea arabica* L. In: LANDSBERG, J.J.; CUTTING, C.V. Environmental effects on crop physiology. New York: **Academic Press**. p.321- 331, 1977.

CAMARGO, A. D., & CAMARGO, M. D. Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. **Agrometeorologia**, v. 16, n. 1, p. 65–68, 2001.

CAMARGO, AP de; PEREIRA, A. R. Agrometeorology of the coffee crop. **Geneva: World Meteorological Organization**, p. 92, 1994.

CARVALHO, C. H. S. et al. Cultivares de Café Arábica de Porte Baixo. In: CARVALHO, C. H. S. (Ed.). **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília: Embrapa Café, 334p, 2008.

CHEN, Y. F.; ETHERIDGE, N.; SCHALLER, E. Ethylene signal perception. **Annals of Botany**, v.95, p. 901-915, 2005.

CIARDI, J.; KLEE, H. Regulation of ethylene-mediated responses at the level of the receptor. **Annals of Botany**, London, v.88, p.813-822, 2001.

CONAB | ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA DE CAFÉ | v.4 - Safra 2017, n. 4 - quarto levantamento, dez. de 2017.

CONAB | ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA DE CAFÉ | v. 5– Safra 2018, n.1- Primeiro levantamento, Brasília, jan. 2018

CORTEZ, J. G. Efeito de espécies e cultivares e do processamento agrícola e industrial nas características da bebida do café. 2002. 71p. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiróz”, Piracicaba, 2001.

COSTE, R. Les caféiers et lês café dans lê monde. **Paris: Larose**, 1955.

CRISOSTO et al. Effects of water deficit on flower opening in coffee (*Coffea arabica* L.). **Tree physiology**, v. 10, n. 2, p. 127-139, 1992.

DAMATTA, F. M. Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, n. 1, p. 1–6, abr. 2004.

DaMATTA, F. M.; RAMALHO, J. D. C. Impactos da seca e estresse de temperatura sobre a fisiologia do café e produção: uma revisão. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.18, p. 5581, 2006

DaMATTA, F. M. et al. Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 4, p. 485-510, 2007.

DAVIS, A. P. et al. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 152, n. 4, p. 465–512, dez. 2006.

DAVIES, William J. et al. Regulation of leaf and fruit growth in plants growing in drying soil: exploitation of the plants' chemical signalling system and hydraulic architecture to increase the efficiency of water use in agriculture. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 350, p. 1617-1626, 2000.

DE CAMARGO, Ângelo Paes. Florescimento e frutificação de café arábica nas diferentes regiões (cafeeiras) do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 20, n. 7, p. 831-839, 1985.

DE OLIVEIRA, R. R. et al. Development in *Coffea arabica* L.: new insights into MADS-box genes. **Plant Reproduction**, v. 27, n. 2, p. 79-94, 2014.

DEUNER, S. et al. Stomatal behavior and components of the antioxidative system in coffee plants under water stress. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 68, n. 1, p. 77-85, jan./fev. 2011.

DOLFERUS, Rudy. To grow or not to grow: a stressful decision for plants. **Plant Science**, v. 229, p. 247-261, 2014.

ECKER, Joseph R. The ethylene signal transduction pathway in plants. **Science**, p. 667-675, 1995.

ENGLISH, Philippa J. et al. Increased 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase activity in shoots of flooded tomato plants raises ethylene production to physiologically active levels. **Plant Physiology**, v. 109, n. 4, p. 1435-1440, 1995.

FÀBREGAS, Norma et al. Auxin influx carriers control vascular patterning and xylem differentiation in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS genetics**, v. 11, n. 4, p. e1005183, 2015.

FAROOQ, M. et al. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. In: **Sustainable agriculture**. Springer Netherlands, 2009. p. 153-188.

FERNANDES-BRUM, Christiane Noronha et al. A panel of the most suitable reference genes for RT-qPCR expression studies of coffee: screening their stability under different conditions. **Tree Genetics & Genomes**, v. 13, n. 6, p. 131, 2017.

FUKUDA, Hiroo. Tracheary element differentiation. **The Plant Cell**, v. 9, n. 7, p. 1147, 1997.

GALLIE, Daniel R. Ethylene receptors in plants-why so much complexity?. **F1000prime reports**, v. 7, 2015.

GARTNER, Barbara L. **Plant stems: physiology and functional morphology**. Academic Press, 1995.

GÓMEZ-CADENAS, Aurelio et al. Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of Cleopatra mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. **Plant Physiology**, v. 112, n. 1, p. 401-408, 1996.

GOUVEIA, Nidia Majerowicz et al. Estudo da diferenciação e crescimento de gemas florais de coffea arabica L. observações sobre antese e maturação dos frutos. 1984.

GREENSPAN, Mark David; SHACKEL, K. A.; MATTHEWS, M. A. Developmental changes in the diurnal water budget of the grape berry exposed to water deficits. **Plant, Cell & Environment**, v. 17, n. 7, p. 811-820, 1994.

GUERRA, A. F. et al. Irrigação do Cafeeiro no Cerrado: estratégia de manejo de água para uniformização da florada. **Comunicado Técnico – EMBRAPA**, 2005.

HAO, D. Y.; OHME-TAKAGI, M.; SARAI, A. Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 26857-26861, 1998.

HUA, Jian et al. Ethylene insensitivity conferred by Arabidopsis ERS gene. **Science**, v. 269, n. 5231, p. 1712-1714, 1995.

ICO. About Statistics of the International Coffee Organization. **International Coffee Organization**, 2017.

JIA, Haiyan et al. Analysis and application of RD29 genes in abiotic stress response. **Acta physiologiae plantarum**, v. 34, n. 4, p. 1239-1250, 2012.

JONES, M. L.; KIM, E. S.; NEWMAN, S. E. Role of ethylene and 1-MCP in flower development and petal abscission in zonal geraniums. **HortScience**, Alexandria, v.36, p.1305-1309, 2001.

KALANTARI, Khosrow M.; SMITH, Aileen R.; HALL, Michael A. The effect of water stress on 1-(malonylamino) cyclopropane-1-carboxylic acid concentration in plant tissues. **Plant Growth Regulation**, v. 31, n. 3, p. 183-193, 2000.

KENDE, Hans; VAN DER KNAAP, Esther; CHO, Hyung-Taeg. Deepwater rice: a model plant to study stem elongation. **Plant Physiology**, v. 118, n. 4, p. 1105-1110, 1998.

LAGO, Isabel et al. Transpiração e crescimento foliar de plantas de mandioca em resposta ao deficit hídrico no solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 11, p. 1415-1423, 2012.

LALONDE, Sylvie et al. The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. **The Plant Cell**, v. 11, n. 4, p. 707-726, 1999.

LANG, ALEXANDER; Düring, H. Partitioning control by water potential gradient: evidence for compartmentation breakdown in grape berries. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, n. 9, p. 1117-1122, 1991.

LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; ROBERT, J.; TROUSLOT, P.; D'HONT, A.; ANTHONY, F.; CHARRIER, A. Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. Genome. *Mol. Gen. Genet*, 1999.

LASHERMES, Philippe et al. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 261, n. 2, p. 259-266, 1999.

LEWIS, Daniel R. et al. Ethylene inhibits lateral root development, increases IAA transport and expression of PIN3 and PIN7 auxin efflux carriers. **Development**, v. 138, n. 16, p. 3485-3495, 2011.

LIGHT, Kenneth M. et al. Perception of the plant hormone ethylene: known-knowns and known-unknowns. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 21, n. 5-6, p. 715-728, 2016.

LIMA, A. A. Ethylene regulation under different watering conditions and its possible involvement in coffee (*Coffea arabica* L.) flowering. **Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras**, p. 151, 2015

LIN, Zhefeng; ZHONG, Silin; GRIERSON, Don. Recent advances in ethylene research. **Journal of experimental botany**, v. 60, n. 12, p. 3311-3336, 2009.

LIU, D. et al. An organ-specific role for ethylene in rose petal expansion during dehydration and rehydration. **J Exp Bot.**, p. 2333–2344, 2013.

LIVRAMENTO, D. E. Morfologia e Fisiologia do Cafeeiro. In: REIS, P. R.; CUNHA, R. L. (Ed). **Café Árábica do plantio á colheita**. Lavras: U.R. EPAMIG SM, 896 p., 2010.

LOVE, Jonathan et al. Ethylene is an endogenous stimulator of cell division in the cambial meristem of *Populus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 14, p. 5984-5989, 2009.

MAGALHAES, A. C.; ANGELOCCI, L. R. Sudden Alterations in Water Balance Associated with Flower Bud Opening in Coffee Plants. **Journal of Horticultural Science**, v. 51, n. 3, p. 419–423, 27 jan. 1976.

MATIELLO, J. B.; GARCIA, A. W. R.; ALMEIDA, S. R. **Como formar cafezais produtivos**. 1. ed. Varginha: Fundação Procafé, 150p., 2009

MARRACCINI, P. et al. RBCS1 expression in coffee: *Coffea* orthologs, *Coffea arabica* homeologs, and expression variability between genotypes and under drought stress. **BMC Plant Biology**, London, v. 11, n. 85, p. 1-23, May 2011.

MCMANUS, Michael T. (Ed.). **The plant hormone ethylene**. Wiley-Blackwell, 2012.

MENG, Y. et al. Precise spatio-temporal modulation of ACC synthase by MPK6 cascade

mediates the response of rose flowers to rehydration. **The Plant Journal**, v. 79, n. 6, p. 941–950, set. 2014.

MES, M. G. Studies on the flowering of *Coffea arabica* L. Various phenomena associated with the dormancy of the coffee flower buds. **Portugaliae Acta Biologica**, v. 5, n. 1, p. 25-44, 1957

MORAIS, H. et al. Escala fenológica detalhada da fase reprodutiva de *coffea arabica*. **Bragantia, Campinas**, v. 67, n. 1, p. 257–260, 2008.

MORGAN, Page W. et al. Does water deficit stress promote ethylene synthesis by intact plants?. **Plant Physiology**, v. 94, n. 4, p. 1616-1624, 1990.

NARAYANA, Isabelle; LALONDE, Sylvie; SAINI, Hargurdeep S. Water-stress-induced ethylene production in wheat: a fact or artifact?. **Plant Physiology**, v. 96, n. 2, p. 406-410, 1991.

O'MAOILEIDIGH, D. D. Gene networks controlling *Arabidopsis thaliana* flower development. **New Phytol**, 201(1):16-30, 2014.

PELEG, Zvi; BLUMWALD, Eduardo. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. **Current opinion in plant biology**, v. 14, n. 3, p. 290-295, 2011.

PERERIRA, A. R.; CAMARGO, A. P.; CAMARGO, M. B. P. **Agrometereologia de cafezais no Brasil**. 1. Ed., Campinas: Instituto Agrônômico, 127 p., 2008

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, 2001

PRAXEDES, S. C. et al. Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. kouillou) leaves. *Environmental and Experimental Botany*, Elmsford, v. 56, n. 3, p. 263-273, July 2006.

RENA, A. B. et al. Cultura do cafeeiro. Fatores que afetam a produtividade. **Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo**, 1986.

RENA, A. B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. In: RENA, A. B. et al. (Ed.). Cultura do cafeeiro-Fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: **Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo**, p.13-106, 1985.

RIBEIRO, A. Panorama setorial: o complexo agroindustrial cafeeiro no Brasil. **Revista Análise, Jundiaí, SP**, 2005.

RODRIGUES SOARES, A. et al. Irrigação e fisiologia da floração em cafeeiros adultos na região da zona da mata de Minas Gerais. **Acta Scientiarum. Agronomy Maringá**, v. 27, n. 1, p. 117–125, 2005.

ROGIERS, Suzy Y. et al. Vascular function in berries of *Vitis vinifera* (L) cv. Shiraz. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 7, n. 1, p. 47-51, 2001.

RŮŽIČKA, Kamil et al. Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis

and transport-dependent auxin distribution. **The Plant Cell**, v. 19, n. 7, p. 2197-2212, 2007.

SAINI, Hargurdeep S.; WESTGATE, Mark E. Reproductive development in grain crops during drought. In: **Advances in agronomy**. Academic Press, 1999. p. 59-96.

SAKIYAMA, Ney Sussumu; PEREIRA, A. A.; ZAMBOLIM, L. Melhoramento do café arábica. **Melhoramento de espécies cultivadas**, p. 203-223, 1999.

SANTOS, Iasminy Silva. Influência do etileno na regulação do florescimento de *Coffea arabica* L. Dissertação (mestrado acadêmico)—Universidade Federal de Lavras, 2016. 105 p.

SOARES, A. R. et al. Irrigação e fisiologia da floração em cafeeiros adultos na região da zona da mata de Minas Gerais. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 27, n. 1, p. 117–125, 2005.

SOBEIH, Wagdy Y. et al. Long-distance signals regulating stomatal conductance and leaf growth in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants subjected to partial root-zone drying. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 407, p. 2353-2363, 2004.

SOLANO, Roberto et al. Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. **Genes & development**, v. 12, n. 23, p. 3703-3714, 1998.

SORCE, Carlo et al. Hormonal signals involved in the regulation of cambial activity, xylogenesis and vessel patterning in trees. **Plant cell reports**, v. 32, n. 6, p. 885-898, 2013.

SKIRYCYZ, Aleksandra et al. Pause-and-stop: the effects of osmotic stress on cell proliferation during early leaf development in *Arabidopsis* and a role for ethylene signaling in cell cycle arrest. **The Plant Cell**, v. 23, n. 5, p. 1876-1888, 2011.

STEPANOVA, Anna N. et al. Multilevel interactions between ethylene and auxin in *Arabidopsis* roots. **The Plant Cell**, v. 19, n. 7, p. 2169-2185, 2007.

SHINOZAKI, Y. K.; SHINOZAKI, K. A novel cisacting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell*, Rockville, v. 6, n. 2, p. 251-264, 1994.

SWARUP, Ranjan et al. Ethylene upregulates auxin biosynthesis in *Arabidopsis* seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. **The Plant Cell**, v. 19, n. 7, p. 2186-2196, 2007.

TRUSOV, Y.; BOTELLA, J. R. Silencing of the ACC synthase gene *ACACS2* causes delayed flowering in pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.]. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 14, p. 3953–3960, 6 set. 2006.

TUDELA, D.; PRIMO-MILLO, E. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid transported from roots to shoots promotes leaf abscission in *Cleopatra mandarin* (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) seedlings rehydrated after water stress. **Plant Physiology**, v. 100, n. 1, p. 131-137, 1992.

TYERMAN, Stephen D. et al. Direct measurement of hydraulic properties in developing berries of *Vitis vinifera* L. cv Shiraz and Chardonnay. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 10, n. 3, p. 170-181, 2004.

Uggla C, Mellerowicz EJ, Sundberg B .Indole-3-acetic acid controls cambial growth in Scots pine by positional signaling. *Plant Physiol* p.113–121,1998.

VAN DE POEL, Bram; VAN DER STRAETEN, Dominique. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene!. **Frontiers in plant science**, v. 5, p. 640, 2014.

VANDERSTRAETEN, Lisa; VAN DER STRAETEN, Dominique. Accumulation and transport of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: current status, considerations for future research and agronomic applications. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 38, 2017.

VOESENEK, L. A. C. J. et al. How plants cope with complete submergence. **New phytologist**, v. 170, n. 2, p. 213-226, 2006.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology*, Palo Alto, v. 57, p. 781-803, 2006.

WANG, Qin et al. Rice CONSTITUTIVE TRIPLE-RESPONSE2 is involved in the ethylene-receptor signalling and regulation of various aspects of rice growth and development. **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 16, p. 4863-4875, 2013.

WANG, Kevin L.-C.; LI, Hai; ECKER, Joseph R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **The plant cell**, v. 14, n. suppl 1, p. S131-S151, 2002.

WANG, Tzann-Wei; ARTECA, Richard N. Effects of low O₂ root stress on ethylene biosynthesis in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill cv Heinz 1350). **Plant Physiology**, v. 98, n. 1, p. 97-100, 1992.

ZHANG, Jianhua; DAVIES, W. J. Sequential response of whole plant water relations to prolonged soil drying and the involvement of xylem sap ABA in the regulation of stomatal behaviour of sunflower plants. **New phytologist**, v. 113, n. 2, p. 167-174, 1989.

ZHEFENG Lin, SILIN Zhong, DON Grierson; Recent advances in ethylene research, **Journal of Experimental Botany**, Volume 60, Issue 12, 1 August 2009, Pages 3311–3336,

ZOBEL, Richard W.; ROBERTS, Lorin W. Effects of low concentrations of ethylene on cell division and cytodifferentiation in lettuce pith explants. **Canadian Journal of Botany**, v. 56, n. 8, p. 987-990, 1978.