



**IASMINY SILVA SANTOS**

**INFLUÊNCIA DO ETILENO NA REGULAÇÃO  
DO FLORESCIMENTO de *Coffea arabica* L.**

**LAVRAS – MG  
2016**

**IASMINY SILVA SANTOS**

**INFLUÊNCIA DO ETILENO NA REGULAÇÃO DO FLORESCIMENTO  
DE *Coffea arabica* L.**

**INFLUENCE OF ETHYLENE IN THE REGULATION OF *Coffea arabica*  
L. FLOWERING**

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

Prof. Dr. Antonio Chalfun Júnior (UFLA/DBI)  
Orientador

**Lavras – MG  
2016**

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

Santos, Iasminy Silva.

Influência do Etileno na regulação do florescimento de *Coffea arabica* L. / Iasminy Silva Santos. – Lavras : UFLA, 2016.

105 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Antonio Chalfun Júnior.

Bibliografia.

1. Cafeeiro. 2. Florescimento. 3. Etileno. 4. 1-MCP. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**IASMINY SILVA SANTOS**

**INFLUÊNCIA DO ETILENO NA REGULAÇÃO DO FLORESCIMENTO  
DE *Coffea arabica* L.**

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

APROVADA em 24 de Fevereiro de 2016.

Dr. Carlos Henrique Siqueira de Carvalho (Embrapa)  
Dr. João Paulo Rodrigues Alves Delfino Barbosa (UFLA/DBI)

Prof. Dr. Antonio Chalfun Júnior (UFLA/DBI)  
Orientador

**Lavras – MG  
2016**

*Aos meus pais, José Carlos Bonfim Santos e Rita de Cássia  
Vieira da Silva, pelo amor e dedicação incondicional. Por todas as  
palavras de incentivo, conforto e por dividir comigo todas as dificuldades  
dessa longa jornada.  
Por acreditar em mim. Sempre.*

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu **Deus**, por conceder-me força e coragem para transpor os obstáculos permitindo-me concretizar sonhos e alcançar vitórias. Por me orientar nas incertezas, sustentar nas fraquezas, amparar nas dificuldades, agradeço com minh'alma.

Aos meus pais, por me ensinarem que é possível modificar aquilo que parecia consumado e que somente a educação seria o caminho para essa transformação. Além de pais, escolheram ser também amigos e parceiros tornando o impossível, possível! Por incentivar incansavelmente meu crescimento profissional, sendo meu abrigo e fonte inesgotável de amor.

Á querida professora, amiga e eterna “Mãe-Orientadora” Daniela Deitos Fries, que com dedicação e paciência ensinou-me muito sobre Fisiologia Vegetal, sendo a principal responsável por eu estar aqui! Exemplo de profissional e fonte de inspiração para seguir a carreira acadêmica. Por guiar-me na busca pelo aprendizado, confiar e acreditar no meu potencial.

Á Welber, meu irmão, pela confiança, companheirismo e por partilhar comigo a alegria das minhas conquistas.

Aos meus avós Ataíde, Carlita e Laurita, pelo zelo, carinho e orações.

Á Louise, Zaninha e Carol, por provar que a distância entre Bahia e Minas Gerais não seria suficiente para findar com anos de amizade. Agradeço por compartilhar comigo das aflições e alegrias.

Áos amigos Zanon e João Guilherme, os quais demonstraram cumplicidade durante os anos de caminhada e que se fizeram presente através de palavras de incentivo e pensamento positivo!

Á 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.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Á Antonio Chalfun Júnior, pela valiosa oportunidade durante o período de estágio. Hoje, como professor e estimado orientador, sou grata pela confiança depositada, ensinamentos e compreensão durante as dificuldades para concluir esse trabalho. O meu muito obrigada por ter contribuído imensamente para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao pós-doutorando André Lima, minha gratidão por tamanha generosidade. Pelo comprometimento para a concretização desse trabalho, fazendo-se presente em todas as etapas, desde as avaliações de campo até as análises de RT-qPCR! Por toda paciência para ensinar-me, pelas conversas e conselhos que contribuíram para minha formação e contribuições científicas que enriqueceram esse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos aos membros e ex-membros do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas pela bondosa recepção desde o período do estágio. Pelos conhecimentos transmitidos, conversas, apoio, por todos os momentos de alegria e amizade construída, tornando-se para mim uma grande família... Em especial, aqueles que sempre atenderam meu chamado, às vezes desesperado, para a condução dos experimentos e avaliações no campo às três horas da tarde, ou da manhã! André, Géssica, Cardon, Torugo, Lucas, Vinícius, Pedro, Andressa e Caroline... Gratidão!

A Cardon e Pedro pela gentileza em auxiliar nas análises estatísticas.

Aos estagiários Matheus, Kauanne e Zé Diogo pelo valioso auxílio durante as análises laboratoriais.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas que me acolheram com carinho. Pela amizade e apoio em todos os momentos, em especial a Kamila, Dayane e Cinthya.

Aos “FisioFriends” Daynara, Fernando, Lorena, Vivianny, Amanda, Kamila, Géssica, Caroline e Débora Valim pela agradável convivência e por mostrar a grandeza da amizade em pequenos detalhes.

Aos colegas do mestrado Mayara, Júnia, Lissa, Chaiane, Cecília, Juliene, Fernando, Daynara, Vivianny, Jéssica, Geovanni, Roniel, Adelcio, e Cleide por partilhar comigo as alegrias e dificuldades dessa caminhada, ensinando-me também a “arte da convivência”.

Aos funcionários do setor de Fisiologia Vegetal, Daniela, Lena (*in memória*), Barrinha, Joel, Odorencio e Tanham pela atenção e pronta disponibilidade para ajudar.

Ao Flávio e Thiago Mesquita por cederem gentilmente a área na Fazenda Cafuá para execução do experimento, bem como pela atenção e disponibilidade.

Aos membros da banca examinadora por terem aceitado o convite, fazendo contribuições enriquecedoras para o trabalho.

Á todos que de alguma maneira contribuíram para realização desse trabalho...

Muito Obrigada!



*“Olhe sempre para frente, mantenha seu olhar fixo no objetivo a ser alcançado.”*

**Provérbios, 4. 25**

**e então...**

*“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e seus planos serão bem-sucedidos”*

**Provérbios, 16. 3**

## RESUMO

O café é uma das mais valiosas exportações agrícolas do mundo e a segunda *commodity* mais comercializada após o petróleo. Essa cultura representa fonte de empregos e agrega volume considerável para a receita do país, sendo indiscutível a sua importância para o cenário socioeconômico local e mundial. A qualidade da bebida de café está diretamente associada ao estágio de maturação dos frutos que são encontrados em diferentes faixas no momento da colheita em virtude do florescimento sequencial, elevando os custos com a produção e gerando bebida de menor qualidade. A assincronia no florescimento do cafeeiro resulta da desuniformidade no desenvolvimento das gemas, processo influenciado por fatores ambientais, considerando que a antese ocorre após um período de deficiência hídrica seguida por precipitação. Alterações no balanço hormonal têm sido observadas após ciclos de restrição hídrica e reidratação, e essa oscilação sobre o status hídrico da planta promoveu o aumento nos níveis de etileno em algumas espécies. Essa constatação levou a associação entre as exigências na fase de florescimento do cafeeiro e o envolvimento do etileno na promoção da antese. A aplicação do 1-MCP (inibidor da ação do etileno) promoveu a antese em cafeeiros em condição de campo. Em casa de vegetação, foi verificado em mudas de café, após um período de restrição hídrica seguido por reidratação, que o perfil de expressão dos genes da rota de biossíntese e sinalização do etileno foram alterados em folha e raiz. O aumento na expressão do precursor do etileno (ACC) na raiz, durante o período seco, e o transporte desse composto para a parte aérea pode ser o sinal para desencadear a antese no cafeeiro, após reidratação. Com o objetivo de melhor entender o envolvimento do etileno na regulação do florescimento, esse trabalho avaliou os efeitos da aplicação exógena de 1-MCP em diferentes características fisiológicas (gs, A, E), e na expressão de genes relacionados à biossíntese e sinalização, em folhas e gemas do cafeeiro sob condição de campo. As avaliações e coletas foram realizadas em diferentes tempos após a implementação dos tratamentos: T1 - controle, T2 - 1-MCP+Break-Thru e T3 - Break-Thru. Houve influência do 1-MCP e Break-Thru nos parâmetros de trocas gasosas e o 1-MCP+Break-thru contribuiu para o aumento no teor relativo de água. As análises de RT-qPCR demonstraram diferente comportamento quanto ao perfil de expressão dos genes (*CaACS1 – like*, *CaACO1 – like*, *CaACO4 – like*, *CaETR4 – like*) em folhas e gemas analisadas nesse estudo e os níveis de expressão foram alterados poucas horas (2h) após aplicação dos produtos. Entretanto, o florescimento ocorreu somente nas plantas tratadas com 1-MCP, na ausência de chuva e irrigação.

Palavras-chave: Cafeeiro. Florescimento. Etileno. 1-MCP

## ABSTRACT

Coffee is one of the most valuable exported agricultural product worldwide as well as the second most traded commodity after oil. This crop represents a source of employment and considerably accounts for the revenue of the country, besides its undeniable importance for local and world socioeconomical scenery. The quality of the coffee drink is directly related to the fruit ripening stage, which is found in different stages at harvesting due to the sequential flowering, increasing costs with the production and generating a lower-quality beverage. The asynchronous flowering of the coffee tree comes from the uneven development of buds, which can be influenced by environmental factors, taking into account that the anthesis takes place after a water deficit period, followed by precipitation. Changes in the hormone balance have been observed after water deficit and rehydration cycles, and such oscillation on the water status of the plant increased the level of ethylene in some species. This finding led to the association between the requirements at the flowering stage of the coffee tree and the involvement of the ethylene in promoting anthesis. The application of 1-MCP (ethylene action inhibitor) triggered the anthesis in coffee trees. And, in coffee seedlings in greenhouse conditions after a period of water shortage followed by irrigation, the profile of gene expression of the biosynthesis route and signaling of ethylene are changed in leaves and roots. The increased levels of the ethylene precursor (ACC) in roots throughout the dry season and the transportation of this compound into shoots may be the signal to trigger the anthesis in coffee tree after rehydration. Thus, in order to better understand the role of the ethylene in regulation of flowering, we analyzed the effects of the exogenous application of 1-MCP in different physiological characteristics and in the expression of genes related to the ethylene biosynthesis and signaling pathways in coffee leaves and bud from plants under field conditions. The evaluations and tissue sampling were carried out in different times treatments implementation: T1 – control, T2 – 1-MCP+Break-Thru, and T3 – Break-Thru. There was influence of 1-MCP and Break-Thru in gas exchange parameters and of 1-MCP contributed to the increase in relative water content. RT-qPCR analyses showed a different behavior in relation to the profile of gene expression in leaves and buds analyzed in the present study (*CaACS1 – like*, *CaACO1 – like*, *CaACO4 – like*, *CaETR4 – like*) and the expression levels were changed a few hours (2h) after applying the products. However, there was flowering only in plants treated with 1-MCP, in the absence of rain and irrigation.

Keywords: Coffee tress. Flowering. Ethylene. 1-MCP.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema das fases fenológicas de <i>Coffea arabica</i> nas condições tropicais do Brasil (Camargo & Camargo, 2001).....	29
Figura 2: Escala detalhada das fases de desenvolvimento floral de <i>Coffea arabica</i> (Adaptado de Lima, 2015).....	31
Figura 3: Representação da assincronia no ciclo reprodutivo do cafeeiro. (A) Desenvolvimento floral não sincronizado em ramo. (B) Nó apresentando diferentes níveis de desenvolvimento: gemas em diferentes estágios, botão floral e flor. (C) Desuniformização na maturação dos frutos promovido por vários eventos de floração..	32
Figura 4: Abortamento floral devido ao déficit hídrico intenso e elevadas temperaturas originando flores com anomalia, as "estrelinhas".....	34
Figura 5: Esquema da regulação do florescimento via sinalização do etileno e interação GA-DELLA (Archad et al., 2007).....	39
Figura 6: Ciclo de Yang: biossíntese do etileno e síntese de metionina (Modificado de Yang & Hoffman, 1984).....	41
Figura 7: Ligação das moléculas de etileno aos receptores associados às membranas (Adaptado de Blankenship, 2001). .....	42
Figura 8: Modelo para via de sinalização que regula respostas das plantas ao etileno: sequência dos receptores envolvidos com a percepção e transdução de sinais (Theologis, 1998).....	45
Figura 9: Métodos de inibição dos efeitos do etileno nas plantas por abordagens ambientais, moleculares e químicas (Serek et al., 2006). .....	47
Figura 10: Ligação competitiva do 1-metilciclopropeno (1-MCP) aos receptores de etileno associados às membranas celulares (Adaptado de Blankenship, 2001).....	50
Figura 11: Espalhamento e cobertura uniforme promovida pelo Break-Thru S240 (Evonik, 2013, 2014).....	51
Figura 12: Representação da fluidez estomatal promovida por surfactantes organossiliconados como Break-Thru S240 na superfícil adaxial (a) e abaxial (b) da folha (Adaptado de Evonik, 2014).....	52

Figura 13: Croqui do experimento conduzido com <i>Coffea arabica</i> cv. Catuaí Vermelha IAC 144. Observa-se que o espaçamento real entre as plantas tratadas foi superior ao representado nesta figura. (T = Tratamento; R= Repetição biológica).....	55
Figura 14: Teor Relativo de Água após aplicação dos tratamentos ao longo do tempo. Médias seguidas pelas mesmas letras comparando os tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). As barras indicam o erro padrão da média de seis repetições.....	63
Figura 15: Condutância estomática (gs) ao longo do tempo em resposta aos diferentes tratamentos. Médias seguidas pelas mesmas letras comparando os tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). As barras indicam o erro padrão da média de seis repetições. ....	66
Figura 16: Taxa fotossintética líquida (A) ao longo do tempo em resposta aos diferentes tratamentos. Médias seguidas pelas mesmas letras comparando os tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). As barras indicam o erro padrão da média de seis repetições. ....	67
Figura 17: Taxa de transpiração (E) ao longo do tempo em resposta aos diferentes tratamentos. Médias seguidas pelas mesmas letras comparando os tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). As barras indicam o erro padrão da média de seis repetições. ....	68
Figura 18: Representação da condição fisiológica e fenológica em condição de campo das repetições biológicas antes da implementação dos tratamentos: (A) T 1 - Controle; (B) T 2 - 1-MCP+BTH; (C) T 3 – BTH. ....	71
Figura 19: Representação da condição fisiológica e fenológica em condição de campo das repetições biológicas após a implementação dos tratamentos: (A) T 1 - Controle; (B) T 2 - 1-MCP+BTH; (C) T 3 – BTH.....	72
Figura 20: Antese ocorrida em plantas de café do tratamento com 1-MCP+BTH 9 dias após a pulverização.....	72
Figura 21: Expressão gênica relativa dos genes <i>CaACSI-like</i> e <i>CaACO1-like</i> em folhas (painel á esquerda) e gemas (painel á direita) de café nos tempos 2, 6 e 24 h após a implementação dos tratamentos: controle, 1-MCP+Break-Thru e Break-Thru.....	76
Figura 22: Expressão gênica relativa dos genes <i>CaACO4-like</i> e <i>CaETR4-like</i> em folhas (painel á esquerda) e gemas (painel á direita) de café nos tempos 2, 6 e 24h após a implementação dos tratamentos: controle, 1-MCP+Break-Thru e Break-Thru.....	78

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Médias diárias de temperatura durante a realização do experimento na Fazenda Cafuá: variação de uma mínima de 15,58°C para máxima de 34,25°C ..... 104

Gráfico 2: Índices mensais de precipitação três meses antes da implantação do experimento e índices diários durante a realização do experimento na Fazenda Cafuá. Durante a realização do experimento a precipitação total foi de 4,8 mm. .... 105

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Grupos de tratamentos do experimento para cv. Catuaí Vermelho IAC144.....	54
Tabela 2: Sequência de primers e eficiência da amplificação por RT-qPCR. ....	62

## LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

- A - Taxa fotossintética líquida ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
- ANOVA – Análise de padrão de variância
- cDNA – DNA complementar
- CeCafé – Conselho dos Exportadores de Café
- $\text{CO}_2$  – Dióxido de carbono
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento
- DNA – Ácido Desoxirribonucléico
- E - Taxa transpiratória ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
- gs - Condutância estomática ao vapor de água ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )
- HCN – Cianeto de Hidrogênio
- mm – Milímetros
- NaCl – Cloreto de Sódio
- ng - Nanogramas
- OIC – Organização Internacional do Café
- P – Precipitação (mm)
- RNA – Ácido Ribonucléico
- RT-qPCR – PCR quantitativo em Tempo Real com Transcrição Reversa
- T - Temperatura do ar ( $^{\circ}\text{C}$ )
- $T_{\text{Max}}$  – Temperatura Máxima do ar ( $^{\circ}\text{C}$ )
- $T_{\text{Min}}$  – Temperatura Mínima do ar ( $^{\circ}\text{C}$ )
- TRA - Teor Relativo de Água (%)
- $\mu\text{L}$  – Microlitros



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	23
2.1 Cafeeiro: origem e classificação botânica.....	23
2.2 Café Arábica ( <i>Coffea arabica</i> L.).....	24
2.2.1 <i>Coffea arabica</i> cultivar Catuaí Vermelho IAC 144.....	25
2.3 Aspectos econômicos do café.....	26
2.4 Fenologia do Cafeeiro.....	28
2.5 Florescimento do cafeeiro: ‘status’ hídrico e quebra de dormência.....	31
2.6 Etileno na regulação do florescimento.....	37
2.7 Etileno: biossíntese, percepção, sinalização e controle.....	39
2.8 1-MCP: inibidor da ação do etileno.....	48
2.9 Surfactante Break-Thru.....	50
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3.1 Local, Período Experimental e Material vegetal.....	53
3.2 Tratamentos e Delineamento Experimental.....	53
3.3 Coleta do Material.....	55
3.4 Análises Fisiológicas.....	56
3.4.1 Trocas gasosas.....	56
3.4.2. Teor Relativo de Água (TRA).....	56
3.5 Análises Estatísticas.....	57
3.6 Análises moleculares.....	57
3.6.1 Extração de RNA.....	57
3.6.2 Tratamento com DNase.....	59
3.6.3 Síntese de cDNA.....	60
3.6.4 Análise da expressão gênica por RT- qPCR.....	60
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
4.2 Análises Fisiológicas.....	63
4.1 Análises da expressão dos genes.....	74
5 CONCLUSÕES.....	82
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

APÊNDICES – Dados Metereológicos .....	104
APÊNDICE A .....	104
APÊNDICE B .....	105

## 1. INTRODUÇÃO

O café é a *commodity* mais comercializada no mundo depois do petróleo (CONAB, 2015) e segundo a Organização Internacional do Café (OIC, 2015), o setor cafeeiro brasileiro entre dezembro de 2014 e novembro de 2015 contribuiu com 36,9 milhões de sacas de 60 kg, destacando-se entre os países exportadores e demonstrando que o mercado internacional continua receptivo ao café brasileiro. Embora o Brasil seja responsável por mais de 30% do mercado internacional de café, a sobrevivência da cafeicultura nacional depende da melhoria em diversos aspectos. Consideram-se especialmente aqueles relacionados com a eficiência da colheita e o aumento na qualidade sensorial da bebida de café, com ênfase no aroma, sabor e adstringência (CHALFOUN; REIS, 2010; NOGUEIRA, 2014; SALVA et al., 2009).

Para manutenção dos altos níveis de produtividade e obtenção de produtos diferenciados torna-se necessário otimizar e aprimorar as etapas de cultivo, colheita e pós-colheita. Dentre os diversos fatores que influenciam a qualidade do produto final, o estágio de maturação dos frutos na fase da colheita é um aspecto importante a ser avaliado. A desuniformidade na maturação dos frutos é consequência das floradas seqüenciais do cafeeiro, um fenômeno que ocorre naturalmente e dificilmente pode ser controlado, em condições naturais (FREITAS, 2013; SÁGIO, 2012). Uma produção com maior porcentagem de frutos cereja (ponto ideal de colheita) aperfeiçoaria o desempenho da colheita manual ou mecanizada (BUDZINSKI et al., 2005) ao fornecer frutos no mesmo estágio de maturação, reduzindo as colheitas parceladas e, conseqüentemente, reduzindo custo com a produção. Além disso, conduziria a uma bebida de qualidade superior resultando em melhor preço e elevando a aceitação nos mercados interno e externo (CARVALHO ; CHALFOUN, 2000; CASTRO et al, 1981; DIAS, 2013; NOGUEIRA et al., 2005). Entretanto, o amadurecimento

uniforme dos frutos é dificultado pelo florescimento assincrônico dos cafeeiros, pois as floradas ocorrem em períodos distintos (BARROS et al., 1978; RENA; BARROS, 2004), acarretando na produção de frutos em diferentes faixas de maturação, com intensidade variável de frutos verdes (DIAS, 2013; PEREIRA et al., 2005). Esse comportamento indefinido no florescimento diminui a qualidade sensorial da bebida e eleva os custos com a produção, pois requer mais de uma etapa de colheita, e por vezes, a colheita e pós-colheita seletiva (DaMATTA et al., 2007).

Dentre os fatores que estão associados com a irregularidade no florescimento do cafeeiro, o status hídrico da planta parece afetar diretamente a sincronização da florada. A necessidade de um período de déficit hídrico, para concentrar a florada, seguido por chuva ou irrigação abundante, para quebrar a dormência das gemas é mencionada com frequência na literatura como estratégia para obtenção de um único evento de floração (ALVIM, 1960; GUERRA et al., 2005; RENA; MAESTRI, 1985; SOARES et al., 2001). A promoção de um período seco parece contribuir para a uniformização dos botões florais, sendo necessário para aquisição de competência e promovendo a antese, que ocorre após reidratação, indicando que o “choque hídrico” é o principal fator para promoção do florescimento no café (CRISOSTO et al., 1992; LIVRAMENTO, 2010; MAGALHÃES; ANGELOCCI, 1976).

Contudo, ainda existem lacunas quanto aos fatores ambientais e mecanismos fisiológicos que podem estar envolvidos nesse processo. Mudanças de sinalização química da raiz para parte aérea após um período de seca seguido por reidratação foi proposto (CRISOSTO et al., 1992), sugerindo que alguns mensageiros químicos, como os fitormônios, sejam capazes de tornar os botões florais aptos para antese, estimulando a floração em algumas espécies. Estudos associando a regulação hormonal com o florescimento do cafeeiro ainda são

escassos, mas acredita-se que eles estejam envolvidos na manutenção e quebra da dormência de botões florais (LIMA, 2015).

O fitormônio etileno está envolvido com inúmeros eventos de crescimento e desenvolvimento, relacionando-se também com respostas das plantas sobre diferentes condições de estresses bióticos e abióticos (ABELES et al., 1992). O estresse hídrico é um dos fatores associados com o aumento na taxa de produção do etileno e genes que codificam as enzimas sintase e oxidase do Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), ACS e ACO respectivamente, integrantes da rota de biossíntese do etileno, podem ser regulados positivamente em plantas nessa condição (KADER, 1992; WANG et al., 2002).

Em relação ao florescimento, o etileno tem se mostrado um regulador desse evento inibindo ou induzindo a antese em algumas espécies. O etileno inibiu o florescimento em *Arabidopsis* (ACHARD et al., 2007), entretanto, induziu a antese em rosas (MENG et al., 2014). Observa-se no estudo de Meng et al. (2014) que um período de restrição hídrica, seguido por reidratação pode levar a um rápido e intenso aumento na produção de etileno, o qual se mostrou responsável por induzir o restabelecimento de água em botões florais de rosas e promover a antese. Essa constatação sugere que o etileno possa estar envolvido na indução do florescimento do cafeeiro

Com base no padrão de floração do cafeeiro, e considerando-se a necessidade de ciclos de desidratação e reidratação para indução floral, Lima (2015) propôs a existência de conexão entre o etileno e a promoção do florescimento em café, de modo que esse hormônio atuaria como um indutor da abertura floral. Seguindo esse princípio, a aplicação do 1-metilciclopropeno (1-MCP), um inibidor da ação do etileno, esperava-se que não ocorresse a antese, em decorrência de chuvas de baixa intensidade ou fora da época correta, o que poderia levar a uma concentração da florada. Entretanto, o autor verificou que o 1-MCP promoveu a antese no cafeeiro. Com o objetivo de melhor compreender

o modo com que o etileno regula o florescimento do cafeeiro, esse trabalho avaliou os efeitos da aplicação exógena de 1-MCP em diferentes características fisiológicas e na expressão de genes relacionados á biossíntese e sinalização, em folhas e gemas do cafeeiro sob condição de campo.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Cafeeiro: origem e classificação botânica

O cafeeiro é uma planta que tem origem nos sub-bosques das florestas da Etiópia, região central da África, e sul do Sudão, localizadas a cerca de 1.600 a 2.000 m de altitude, propensas a oscilações de temperaturas de 17°C a 26°C (CAMARGO; PEREIRA, 1994; LIVRAMENTO, 2010). São em geral árvores ou arbustos tropicais que pertencem a família *Rubiaceae* e gêneros *Coffea* (subgêneros: *Coffea* e *Baracoffea*) e *Psilanthus* (subgêneros *Psilanthus* e *Afrocoffea*). O subgênero *Coffea* possui cerca de 103 espécies identificadas incluindo as espécies de importância econômica como *C. arabica* (café Arábica), *C. canephora* (café Robusta\Conilon), *C. liberica* (café Libérica), e *C. dewevrei* (café Excelsa) (DAVIS et al., 2006; GUERREIRO-FILHO et al., 2008).

Apesar de descoberto na Etiópia atribui-se grande importância aos árabes pela propagação da cultura e do consumo do café, de tal modo, que nome “café” tem origem da palavra árabe “qahwa”, que significa vinho. Por isso, o café era conhecido como “vinho da Arábia”. Percorrendo algumas regiões a partir do oriente, a cultura foi introduzida na América pelos holandeses chegando ao Brasil em 1727. Os primeiros cafezais brasileiros descendem exclusivamente da espécie *Coffea arabica* cv. Arabica, inicialmente cultivada em Belém expandindo-se rapidamente para as demais regiões do país (CHALFOUN; REIS, 2010; GUERREIRO-FILHO et al., 2008; SOUZA ; LORENZI, 2005).

## 2.2 Café Arábica (*Coffea arabica* L.)

O cafeeiro arábica é um arbusto monocaule, perene com até 6,0 metros de altura, em condições de tratos culturais, podendo alcançar até 10,0 metros sem nenhum tipo de condução. 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 horizontalmente, os ramos plagiotrópicos. Nesses ramos desenvolvem-se as gemas florais que originarão os frutos, de modo que, os ramos plagiotrópicos são também conhecidos como ramos produtivos. As folhas, geralmente, localizam-se nos ramos plagiotrópicos em posição oposta. São ovaladas ou sublanceoladas, com bordas onduladas, nervuras secundárias e lâmina foliar variando de 12 a 24 cm. Possuem coloração verde-escura e a face adaxial apresenta aspecto brilhante. Quanto ao sistema radicular, a distribuição espacial das raízes não apresenta padrão definido, podendo alcançar até 2 metros de profundidade (ALVES, 2008; COSTE, 1955; EMBRAPA, 2001).

Esta espécie é a única descrita no gênero *Coffea* como alotetraplóide ( $2n = 4x = 44$  cromossomos) possuindo 4 conjuntos do número básico de cromossomos do gênero ( $n = 11$ ). Quanto à reprodução, é uma espécie autogâmica com cerca de 90% das suas flores fertilizadas com gametas (pólen e óvulo) da mesma planta e apenas 10% de polinização cruzada (CARVALHO; MÔNACO, 1964; CHALFOUN; REIS, 2010; LASHERMES et al., 1999; SAKIYAMA et al., 1999). O surgimento de suas flores origina-se do desenvolvimento das gemas nas axilas dos pares de folhas com os ramos primários. As flores são hermafroditas possuindo de 2-19 flores por axila formando inflorescências denominadas glomérulos. Possuem um pedicelo e cálice curto com cinco segmentos, corola formada por cinco pétalas brancas



soldadas entre si e, para cada pétala, um estame curto onde se localiza as anteras. O ovário é inferior com duas câmaras, cada uma contendo um óvulo (ALVES, 2008; FREE, 1993; KLEIN et al., 2003).

Os frutos de *C. arabica* são uma drupa ovóide bilocular, geralmente, com duas sementes e de formato oblongo. Quando na fase de maturação o exocarpo pode apresentar coloração vermelha ou amarela, dependendo da cultivar. O mesocarpo (mucilagem) é relativamente aquoso e doce e, o endocarpo (pergaminho) é espesso envolvendo cada semente separadamente. Os grãos são constituídos principalmente do endosperma de coloração azul-esverdeada de composição variável: água, polissacarídeos (50% a 55% da matéria seca do grão), lipídeos (12% - 18%), proteínas (11% - 13%), cafeína, dextrina, galactomananas, celulose, ácido clorogênico, minerais, dentre outros. Existe grande correlação entre essas características e a qualidade da bebida de café, de modo que, para o café arábica o sabor da bebida é suave, com elevada acidez e baixa porcentagem de cafeína e ácido clorogênico (ALVES, 2008; CORTEZ, 2001; COSTE, 1955; EMBRAPA, 2001).

### **2.2.1 *Coffea arabica* cultivar Catuaí Vermelho IAC 144**

O grupo da cultivar Catuaí originou-se como híbrido, entre o cruzamento de cafeeiros “Caturra Amarelo” e “Mundo Novo” realizado pela Comissão de Café do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). Desta recombinação surgiram as linhagens de “Catuaí” conhecidas atualmente, incluindo a “Catuaí Vermelho IAC 144” (CARVALHO et al., 2008; PEREIRA et al., 2010).

A principal característica de plantas dessa cultivar é possuir internódios curtos apresentando, portanto, porte baixo. Isto favorece o plantio adensado facilitando o manejo e tornando a colheita mais econômica. A arquitetura da

copa é cilíndrica com diâmetro médio, as folhas novas são verde-claro e as adultas, verde-escuro com bordas pouco onduladas. A axila foliar possui de 3 a 5 inflorescências e o florescimento ocorre principalmente entre setembro e outubro. A maturação ocorre entre os meses de maio e junho, coincidindo com o período chuvoso, sendo, contudo, mais tardia e desuniforme em relação à variedade “Mundo Novo”. O fruto maduro apresenta coloração vermelha, as sementes são medianas, com formato curto e largo. Apesar de suscetíveis a ferrugem e nematóides, são vigorosas, altamente produtivas e resistentes à seca, além de produzir bebida de excelente qualidade. Tais características tornaram essa cultivar uma das mais difundidas para plantio comercial no Brasil (CARVALHO et al., 2008; EMBRAPA, 2001; MATIELLO et al., 2009).

### 2.3 Aspectos econômicos do café

A expansão no cultivo e comercialização do café estimulou a criação da primeira bolsa de café em Nova Iorque por volta de 1732, tornando o produto uma *commodity* alcançando comercialização a nível mundial. Atualmente, o café é o produto agrícola mais comercializado no mundo e para alguns países das regiões tropicais e subtropicais constitui uma das principais fontes para o desenvolvimento econômico e social. Essa cultura é cultivada em mais de 80 países proporcionando para aproximadamente 25 milhões de pessoas na América Latina, África e Ásia uma fonte de subsistência (CHALFOUN; REIS, 2010; LASHERMES et al., 2008; MARRACCINI et al., 2012).

Apesar da diversidade de espécies do gênero *Coffea*, apenas *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre ex Froehner são produzidas em escala comercial, sendo responsáveis por 64% e 36% da produção mundial, respectivamente, destacando-se *Coffea arabica* L. como a mais importante em termos econômicos (CONAB, 2015; SANTOS et al., 2015).

No Brasil, estima-se que a área total plantada com café arábica e conilon correspondem a 2.248,9 mil hectares, em que, desse total, 326,8 mil hectares (14,5%) estão em formação e 1.922,1 mil hectares (85,5%) estão em processo produtivo. Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Rondônia, Paraná, e Goiás representam 98,65% da produção nacional. Minas Gerais concentra o cultivo majoritário numa área de 975,27 mil hectares, com predomínio para a espécie arábica que totaliza 98,64% da área de café plantada no estado, equivalendo a cerca de 50,2% da área plantada no Brasil. Desse modo, a safra mineira de 2015 gerou 22,3 milhões de sacas, com predomínio para produção de café arábica (CONAB, 2015).

De acordo com os dados do Conselho dos Exportadores de Café do Brasil (CeCafé), em novembro de 2015, as exportações brasileiras foram 6,9% maior em comparação com o ano de 2014, destacando-se o incremento de 14,1% no embarque de café arábica e, de modo geral, registrando a receita cambial de US\$ 498.341 milhões. As exportações brasileiras do ano safra 2014/2015 foram recordes observando-se o quarto levantamento de safra de café publicado pela Conab, com a produção de 43,24 milhões de sacas de 60Kg do produto beneficiado, sendo 32,05 e 11,19 milhões de sacas do café arábica e conilon, respectivamente. Em termos de volume, o café arábica correspondeu a 78,3% das exportações brasileiras e o conilon, 12,1%, tendo como principais mercados de destino os Estados Unidos e Alemanha. Para o ano safra 2015\16, estima-se que o volume de sacas já exportadas esteja na ordem de 3,2 milhões. (CeCafé; CONAB; OIC, 2015).

A partir desses dados confirma-se que o café é um importante produto da balança comercial agrícola brasileira, destacando o país no cenário do agronegócio mundial como principal exportador e como o segundo maior mercado consumidor. Considerando a tendência anual de aumento no consumo interno e externo de café, o Brasil tem dedicado maior atenção para a

valorização do produto visando transformar o grão beneficiado numa bebida de melhor qualidade (ABIC, 2015; FREITAS, 2013; NOGUEIRA, 2014; SANTOS et al., 2015).

## 2.4 Fenologia do Cafeeiro

O ciclo fenológico completo do cafeeiro ocorre em dois anos, diferindo da maioria das espécies as quais florescem na primavera e frutificam no mesmo ano fenológico (GOUVEIA, 1984). Para o cafeeiro arábica as fases fenológicas foram esquematizadas segundo as condições tropicais brasileiras (Figura 1), compreendendo 6 fases, divididas entre dois anos, onde as duas primeiras fases ocorrem no primeiro ano fenológico e as demais fases no segundo ano (CAMARGO; CAMARGO, 2001).

No primeiro ano ocorre o crescimento vegetativo caracterizado pelo desenvolvimento dos ramos plagiotrópicos (do grego *plágios*: oblíquo, transversal) a partir dos ramos ortotrópicos (do grego *orthós*: reto, normal). A primeira fase, que compreende os meses de setembro a março, tem início a partir da formação das gemas axilares nos nós dos ramos plagiotrópicos primários. Portanto, o tamanho e a qualidade da safra no ano seguinte é impactada diretamente pela quantidade de flores que a planta será capaz de produzir a partir dos ramos e gemas desenvolvidos no ano anterior (CAMARGO; CAMARGO, 2001; LIVRAMENTO, 2010; RENA; GUIMARÃES, 2000; RENA et al., 1986; THOMAZIELLO et al., 2000;). Na segunda fase, abril a agosto, a ocorrência de dias curtos estimula a indução floral transformando gemas axilares (vegetativas), produzidas na fase anterior, em gemas florais. Nos meses finais desta fase (julho- agosto) as gemas iniciam um período de repouso (dormência), permanecendo nesse estado por semanas até o início da próxima fase no segundo ano fenológico (CAMARGO; CAMARGO, 2001; CAMARGO; FRANCO, 1985).

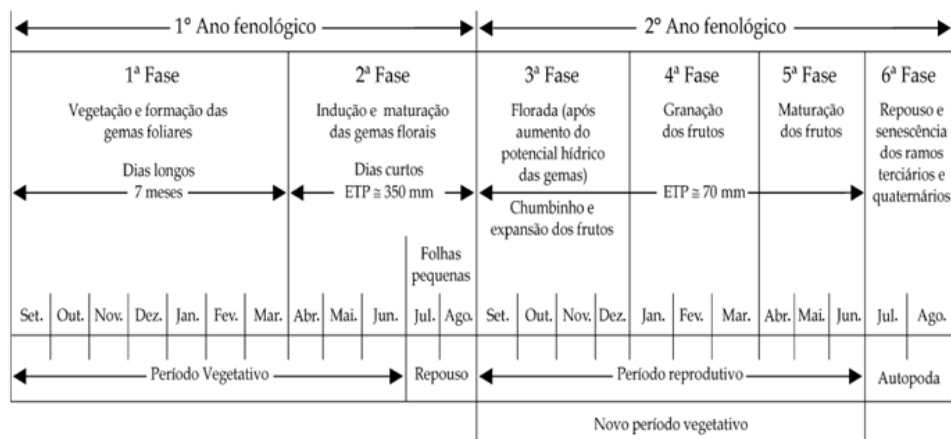


Figura 1: Esquema das fases fenológicas de *Coffea arabica* nas condições tropicais do Brasil (Camargo & Camargo, 2001).

A terceira fase (setembro-dezembro) corresponde ao início do segundo ano fenológico caracterizado pela florada cerca de 8 a 15 dias após o “choque hídrico” nas gemas florais maduras, causada por chuva ou irrigação. Seguida da antese ocorre a fecundação, que para *C. arabica* já representa 94% logo após a abertura floral culminando na formação dos chumbinhos (estádio inicial dos frutos), seguido pela sua expansão (CAMARGO; CAMARGO, 2001; LIVRAMENTO, 2010). A quarta fase (janeiro-março) consiste na etapa de granação dos frutos, ocorrendo a solidificação dos líquidos internos formando os grãos. Na quinta fase, os frutos aumentam o tamanho e desenvolvem mudanças na coloração, caracterizando o período de maturação entre abril e junho. Finalizando o ciclo fenológico, na sexta fase (julho a agosto) ocorre a senescência e abscisão de ramos produtivos, terciários e quaternários, evento conhecido com auto-poda (CAMARGO; CAMARGO, 2001; KUMAR, 1979). As três primeiras fases do segundo ano fenológico correspondem ao período

reprodutivo do cafeeiro, onde a fase de frutificação é composta pelo vingamento floral, desenvolvimento dos frutos e maturação (CAMARGO; CAMARGO, 2001; LIVRAMENTO, 2010).

A transição de gemas do estágio vegetativo para o reprodutivo é um processo irreversível que compreende três etapas: indução, evocação e iniciação. A indução é um evento que resulta das condições fisiológicas iniciadas nos tecidos a partir de estímulos ambientais, como fotoperíodo, permitindo que a planta esteja apta para o florescimento. Na fase de evocação formam-se os primórdios florais a partir de processos de natureza morfológica, bioquímica e fisiológica permitindo que na fase de iniciação a gema “evocada” torne-se reconhecível como uma gema floral (BERNIER et al., 1981; KRAJEWSKI; RABE, 1995; LIVRAMENTO, 2010; MELO; SOUZA, 2011; MORAIS et al., 2008; RENA et al., 1986). Após essa série de eventos as gemas florais crescem continuamente durante dois meses até atingirem de 4 a 8 mm, no máximo (ALVES et al., 2003; CANNELL, 1985).

A escala detalhada das fases reprodutivas do cafeeiro arábica foi dividida em quatro grandes fases, a saber: desenvolvimento da gema floral (G), floração (FL), frutificação (F) e maturação (M). Dentro de algumas fases realizou-se subdivisões visando facilitar a identificação através da morfologia externa. Assim, a fase G foi subdividida de acordo com o tamanho das gemas (Figura 2), 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 arabica* (Adaptado de Lima, 2015).

## 2.5 Florescimento do cafeeiro: ‘status’ hídrico e quebra de dormência

O florescimento do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) compreende uma sequência complexa de eventos morfofisiológicos e bioquímicos e sofre influência de fatores ambientais como temperatura, fotoperíodo e suprimento de água, interferindo no desenvolvimento das gemas vegetativas e reprodutivas (RENA; BARROS, 2004). O comportamento fenológico da cultura é caracterizado pela ausência de sincronia floral que resulta do desenvolvimento não uniforme dos botões florais. Essa irregularidade promove a antese em tempos distintos ocasionando vários eventos de floração e pode ser identificada, muitas vezes, em um único ramo ou nó (Figura 3). Nessa condição é possível encontrar gemas florais em diferentes níveis de desenvolvimento em conjunto com flores, acarretando na maturação desuniforme dos frutos (CRISOSTO et al., 1992; MAJEROVICZ; SÖNDAHL, 2005).

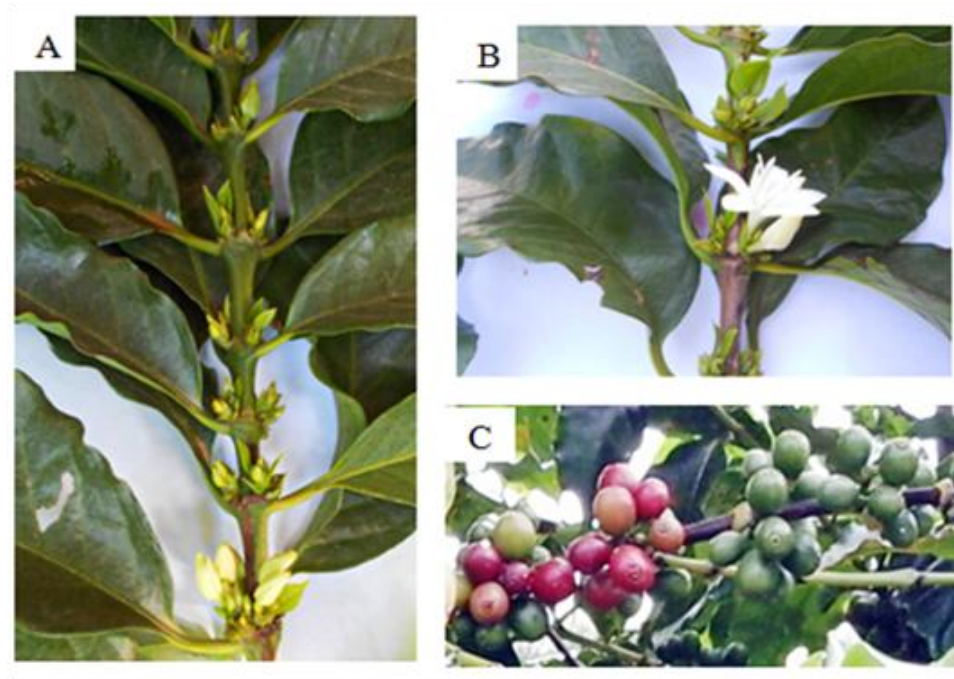


Figura 3: Representação da assincronia no ciclo reprodutivo do cafeeiro. (A) Desenvolvimento floral não sincronizado em ramo. (B) Nó apresentando diferentes níveis de desenvolvimento: gemas em diferentes estágios, botão floral e flor. (C) Desuniformização na maturação dos frutos promovido por vários eventos de floração.

A floração do cafeeiro foi dividida por Rena e Maestri (1985) em quatro fases sequenciais: indução floral, diferenciação floral, dormência e antese. Após as fases de indução e diferenciação os brotos vegetativos encontram-se aptos para originar botões florais os quais se tornam responsivos a estímulos internos, como hormônios, e a diversos fatores ambientais (SOARES et al., 2005; ZIK; IRISH, 2003). Nesse período a duração do desenvolvimento até a próxima fase compreende aproximadamente dois meses. A continuidade do processo depende de uma etapa onde o desenvolvimento floral é estagnado no estágio G4, permanecendo em um estado dormente que pode durar várias semanas (BARROS et al., 1978; MES, 1957). Na literatura são registradas poucas



informações detalhadas sobre os eventos fisiológicos que ocorrem durante a dormência dos botões florais e quais fatores estariam associados com esse mecanismo, mas, em geral, acredita-se que exista uma relação estreita entre a fase dormente e o “status” hídrico dos cafeeiros (CRISOSTO et al., 1992; MAGALHÃES; ANGELOCCI, 1976).

A deficiência hídrica acentuada e prolongada pode impactar negativamente o ciclo de vida e produtivo do cafeeiro, sendo este efeito intensificado quando associado com altas temperaturas. O sucesso para a antese depende além dos fatores genéticos, das condições ambientais, pois déficit hídrico combinado com temperaturas extremas ( $>30^{\circ}\text{C}$ ) durante as fases de desenvolvimento levam a formação de flores “estrelinhas”, caracterizadas pela desidratação precoce e abortamento do botão floral (Figura 4). 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; CAMARGO, 2001; DaMATTA; RAMALHO, 2006).

A maturação das gemas florais é concluída após exposição a um período seco e, possivelmente, a necessidade em impor um déficit de água adequado durante o ciclo reprodutivo do cafeeiro esteja relacionada com a promoção da uniformidade no desenvolvimento das gemas (MAGALHÃES; ANGELOCCI 1976; RENA; MAESTRI, 1985). Foi demonstrado que o desenvolvimento dos meristemas florais em cada gema também é assíncronico (DE OLIVEIRA et al., 2014), corroborando para o comportamento floral irregular nesta espécie. Portanto, o período de dormência, que nas condições tropicais brasileiras coincide com o período seco, (ALVIM, 1960; BROWNING, 1977; CAMARGO; CAMARGO, 2001) seria vantajoso para permitir que botões florais em diferentes fases equiparassem seu desenvolvimento até o estágio G4 (fase em que as gemas tornam-se sensíveis a responder estímulos e retomar o

crescimento), sendo a antese iniciada logo após as primeiras chuvas da estação (MES, 1957; RENA; MAESTRI, 1985).



Figura 4: Abortamento floral devido ao déficit hídrico intenso e elevadas temperaturas originando flores com anomalia, as "estrelinhas".

Alguns trabalhos mostram que um período seco seguido por precipitação ou irrigação é necessário para que a dormência seja quebrada e a antese ocorra, desencadeando a floração (ALVIM, 1960; MAGALHÃES; ANGELOCCI 1976). Durante o período seco os potenciais de água foliar são reduzidos, e em café, foi verificado que em experimentos de campo com plantas submetidas à restrição hídrica por cerca de 70 dias, obteve-se potencial hídrico foliar de -2,0MPa e a antese ocorreu 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).

Dentre as variáveis climáticas, oscilações na pluviosidade e temperatura afetam fortemente a produtividade e qualidade da bebida. No entanto, a duração e intensidade do estresse hídrico não podem ser padronizadas, pois o cultivo da cafeicultura estende-se por regiões com grande variabilidade climática, sendo inviável estipular o período e valores adequados para imposição do déficit hídrico (GARDIN, 2006; MES, 1957). De maneira semelhante, a distribuição e intensidade da chuva necessária para estimular a florada ainda não apresentam valores exatos. Costuma-se relacionar a quantidade de chuva com a duração e intensidade do período seco, assim, 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; RAMÍREZ et al., 2011). Quanto à temperatura, alguns autores consideram que a amplitude térmica de 10°C pode ser favorável para a sincronização da florada, enquanto outros atribuem à redução da temperatura, que costuma acompanhar as chuvas, um papel essencial na quebra da dormência dos botões florais (RAMÍREZ et al., 2011). Como exposto acima, sabe-se apenas que 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).

Crisosto et al. (1992) demonstraram que cafeeiros submetidos à restrição hídrica obtendo potenciais hídricos ante-manhã inferiores a -0,8MPa, após re-irrigados, restabeleceram o condicionamento hídrico e apresentaram abertura floral. Os mesmos autores verificaram que para as plantas irrigadas continuamente não foi verificada antese, pois os botões mantiveram-se no estágio G4, indicando que sem um déficit de água não houve progresso para as fases seguintes. 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. 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. Esse processo resulta da absorção de água pelas folhas, desencadeando um rápido influxo para os botões florais (ALVIM, 1973; BROWNING, 1977; MAGALHÃES; ANGELOCCI, 1976;). 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).

Quando na fase dormente, os botões florais encontram-se no estágio G4 de desenvolvimento e são capazes de responder a diferentes estímulos. Possivelmente a capacidade em interagir com sinais endógenos e exógenos nessa fase esteja associada com o desenvolvimento de um feixe vascular contendo xilema secundário. Gemas em fases anteriores a G4 apresentam pouca quantidade de pequenos elementos do xilema primário, 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). Em um experimento conduzido com plantas de café submetidas a fracionamento do sistema radicular (raiz-split) sob diferentes condições, verificou-se que nas plantas com ambos os sistemas radiculares irrigados frequentemente não houve redução no potencial hídrico (ante-manhã e meio-dia) e também não ocorreu floração. Plantas em situação oposta, ou seja, com ambos os sistemas radiculares mantidos sobre seca, reduziram o potencial hídrico, ocorrendo floração quando reidratadas. Interessantemente, cafeeiros com um sistema radicular irrigado e outro sobre seca não apresentaram redução no potencial hídrico, mas exibiram floração. Esses resultados sugerem que independentemente do “status” hídrico foliar, quando em condições de seca (ainda que não seja um déficit hídrico severo) cafeeiros são estimulados ao florescimento e, provavelmente, o sinal para floração é transportado, após a

reidratação, da região mais seca do sistema radicular para a parte aérea, tornando as gemas florais competentes e induzindo a antese (CRISOSTO et al., 1992).

A biossíntese e o fluxo de alguns hormônios são alterados durante o déficit hídrico, desencadeando respostas nos vegetais em condições de estresse (ALBACETE et al., 2014; KOHLI et al., 2013). Tem sido bem documentado que o Ácido Abscísico (ABA) possui sua síntese estimulada quando plantas são submetidas á seca (WILKINSON; DAVIES, 2002; ZHANG et al., 2015). Além do ABA, a expressão de genes relacionados com a biossíntese e sinalização do etileno também têm sido reguladas positivamente sob estresse hídrico em algumas espécies (BELTRANO et al., 1997; YANG et al., 2014). A expressão diferencial desses genes parece estar sendo regulada por ciclos de desidratação seguidos por reidratação, promovendo o aumento na produção de etileno em órgãos florais (LIU et al., 2013). Aparentemente, a reidratação provocou um rápido aumento na síntese de etileno, de modo que, esse aumento atuou como um sinalizador para restabelecer o conteúdo de água nas flores, promovendo a abertura floral (LIU et al., 2013; MENG et al., 2014).

## **2.6 Etileno na regulação do florescimento**

O florescimento é caracterizado pela transição da fase vegetativa para a fase reprodutiva, marcada por modificações morfofisiológicas reguladas pela interação de fatores endógenos e exógenos (SPANUDAKIS; JACKSON, 2014). Diferentes rotas já foram identificadas e relacionadas com a regulação do florescimento, entre as quais: vernalização, temperatura e a regulação hormonal via Giberelina (GA) (POSÉ et al., 2012; SRIKANTH; SCHMID, 2011). A relação do etileno com o florescimento já foi detectada em algumas espécies, entretanto, a sua ação ainda permanece em discussão. Em algumas espécies o etileno demonstrou ser um indutor da abertura floral, como ocorreu em cravo e

petúnia (JONES; WOODSON, 1997; TANG; WOODSON, 1996), já em rosas foi observada promoção da antese, o que parece contraditório uma vez que, normalmente, nesta espécie ocorre inibição da abertura floral pelo etileno (LUO et al., 2013; REID et al., 1989).

Na via da Giberelina há indícios de que o etileno atue como mediador para regular o florescimento. Nos resultados obtidos por Achard et al. (2007), o atraso no florescimento em *Arabidopsis* foi promovido pelo etileno ao reduzir os níveis endógenos de GAs ativas e favorecer o acúmulo de proteínas DELLAs, corroborando com os experimentos descritos por LUO et al. (2013), onde a abertura floral foi inibida em rosas pela promoção da expressão dos genes das proteínas DELLAs. Proteínas DELLAs são repressoras de GAs e estão ativas na ausência desse hormônio, atuando como um regulador negativo da sinalização através do bloqueio da expressão dos genes induzidos pelas giberelinas. Quando ocorre a ligação de GA ao receptor, esta é degradada pelo proteassomo 26S permitindo a expressão dos genes induzidos por GA (CAO et al., 2006; FUKAZAWA et al., 2014; YU et al., 2012;). O acúmulo de proteínas DELLAs atrasa o florescimento ao reprimir a expressão dos genes LEAFY (FLY) e SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1) (Figura 5), envolvidos na sinalização para ativação dos genes de identidade de meristema, os quais são capazes de converter o meristema apical em meristema de inflorescência (ACHARD et al., 2007; O'MAOILEIDIGH et al., 2014).

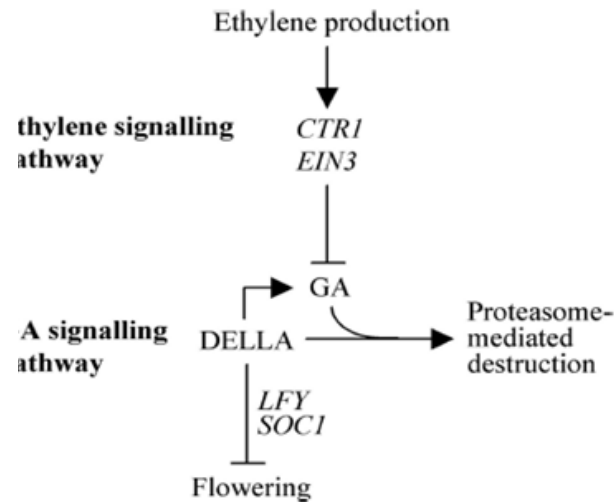


Figura 5: Esquema da regulação do florescimento via sinalização do etileno e interação GA-DELLA (Archad et al., 2007).

## 2.7 Etileno: biossíntese, percepção, sinalização e controle

O etileno ( $C_2H_4$ ) é um hormônio gasoso que regula inúmeros eventos de crescimento e desenvolvimento nas plantas, tais como germinação de sementes, maturação de frutos, senescência, abscisão e desenvolvimento de pêlo radicular (ABELES et al., 1992; CHEN et al., 2005; JOHNSON; ECKER, 1998). Em virtude da sua estrutura, é caracterizado como o composto orgânico mais simples que modula diversos processos fisiológicos nos vegetais (PEREIRA; BELTRAN, 2002; SANTOS, 2012).

Este hormônio é produzido naturalmente em todos os tecidos de plantas superiores. Quanto ao transporte, difunde-se facilmente nos tecidos vegetais e espaços intercelulares por se tratar de um composto volátil (ALONSO; ECKER, 2001; TANG et al., 2008; VILAS BOAS, 2002). Sua síntese autocatalítica é

rigorosamente controlada por sinais internos durante o ciclo de vida das plantas, podendo ser estimulada também em resposta a estímulos externos, bióticos e abióticos, como ferimentos mecânicos (herbivoria, infecção por patógenos), estresse hídrico, salino, térmico, substâncias químicas e também por outros fitormônios (FAGAN, et al., 2015; SCHRODER et al., 2007; WANG et al., 2002; ZIMMER, 1998), sendo considerado um hormônio do estresse devido a sua síntese ser induzida por diversos sinais de estresse (KENDE, 1993). Essa complexa rede de sinalização em resposta a diferentes estímulos internos e ambientais são regulados por genes associados a expressão das enzimas da rota de biossíntese do etileno, sintase do ACC (ACS) e oxidase do ACC (ACO), as quais pertencem a famílias multigênicas (JOHNSON; ECKER, 1998; WANG et al., 2005).

A biossíntese do etileno é iniciada pela conversão do aminoácido metionina em S-adenosilmetionina (S-AdoMet) pela ação da enzima Sintetase do S-AdoMet (Figura 6). Esta enzima requer um ATP por molécula de S-AdoMet sintetizada, de forma que o metabolismo respiratório é aumentado para suprir a demanda energética (BARRY; GIOVANNONI, 2007; MIYAZAKI; YANG, 1987; WANG et al., 2002). A etapa seguinte é a conversão do S-AdoMet em ACC em uma reação catalisada pela ACS, sendo esta a etapa limitante para síntese do etileno, uma vez que, o ACC é o precursor imediato do etileno (ADAMS; YANG, 1979; KENDE, 1993). 5-Metiltioadenosina, um subproduto da reação com ACS, é utilizada como fonte para regenerar metionina através do ciclo de Yang. A biossíntese do etileno é concluída quando a enzima ACO promove a oxidação do ACC formando etileno em uma reação que também produz  $\text{CO}_2$  e HCN (YANG; HOFFEMAN, 1984).



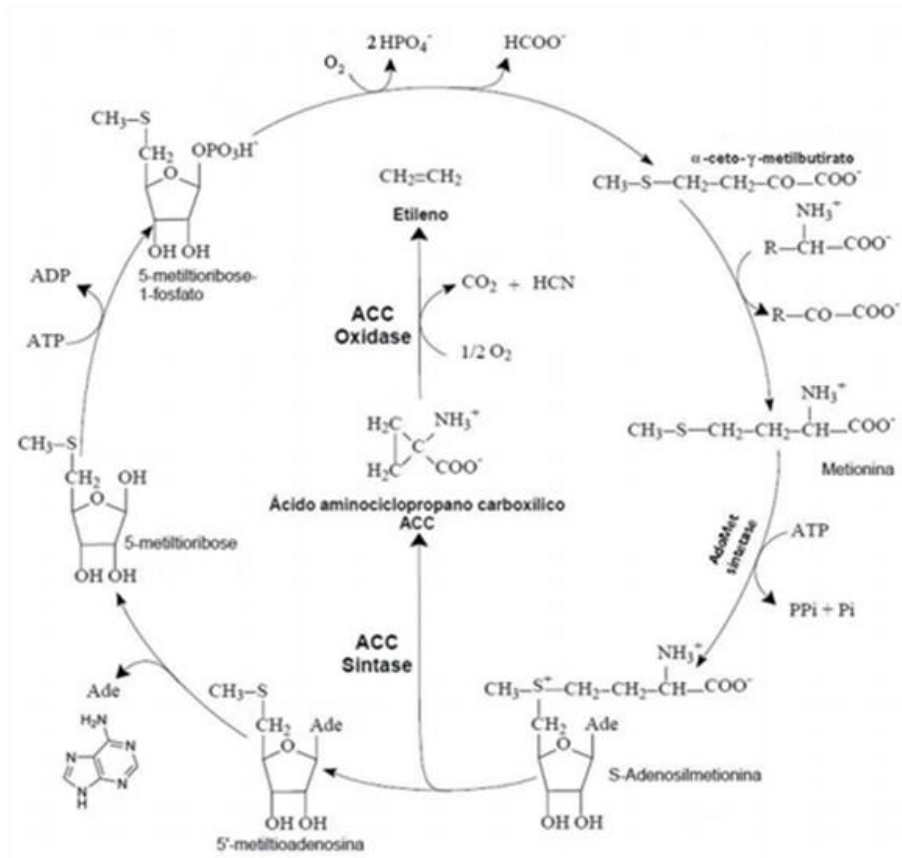


Figura 6: Ciclo de Yang: biossíntese do etileno e síntese de metionina (Modificado de Yang & Hoffman, 1984).

A percepção do etileno ocorre a partir da sua ligação aos receptores localizados nas membranas celulares com auxílio do co-fator cobre (CAVASINI, 2013; CHEN et al., 2002; RODRIGUEZ et al., 1999; WOESTE; KIEBER, 2000). A junção etileno-receptor forma dímeros que funcionam como um mecanismo chave-fechadura, onde o “encaixe” das moléculas “desbloqueia” (Figura 7) os receptores conduzindo a uma cascata de sinalização nos tecidos

vegetais, atuando como ponto de regulação para indução de respostas (BLANKENSHIP, 2001).

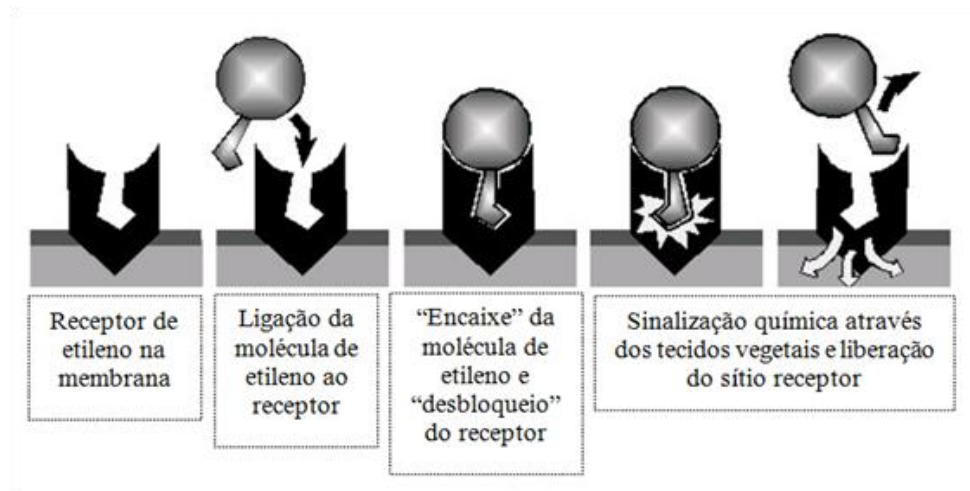


Figura 7: Ligação das moléculas de etileno aos receptores associados às membranas (Adaptado de Blankenship, 2001).

A importância do etileno para o crescimento e desenvolvimento das plantas foi validado considerando-se que os componentes essenciais para a via de percepção e sinalização foi identificada como conservada em diversas espécies vegetais. A primeira descoberta dos principais elementos da rota ocorreram em *Arabidopsis* sendo demonstrado que a percepção do etileno ocorre através de receptores que pertencem a uma família de 5 proteínas: ETR1 (*Ethylene Receptor 1*), ETR2 (*Ethylene Receptor 2*), ERS1 (*Ethylene Response Sensor 1*), ERS2 (*Ethylene Response Sensor 2*) e EIN 4 (*Ethylene Insensitive 4*) (CHANG et al, 1993; CZARNYA et al., 2006; GUO; ECKER, 2004; HUA et al, 1995; HUA; MEYEROWITZ, 1998; SAKAI et al., 1998). Esses receptores

foram agrupados em duas subfamílias com base nas similaridades estruturais: receptores que apresentam três regiões inter-membrana na porção N-terminal (onde ocorre a ligação do etileno) e uma região de histidina quinase conservada na região C-terminal englobam ETR1 e ERS1 e pertencem a subfamília ETR1, enquanto que, os receptores que possuem quatro domínios na região N-terminal e um domínio de histidina carente em elementos considerados importantes para a atividade catalítica na região C-terminal englobam ETR2, EIN4, e ERS2 na subfamília ETR 2 (HALL et al., 2000; HUA, et al., 1998; SCHALLER; BLEECKER, 1995).

Os receptores são proteínas-chave na rota de sinalização do etileno, pois a ligação desse hormônio ao receptor conduz a uma cascata de sinalização para alteração no padrão de expressão dos genes associados com a resposta ao etileno (SEREK et al., 2006). Esses 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.

As respostas ao etileno resultam de mecanismos de ação controlados por regulação negativa (HUA; MEYEROWITZ, 1998; TIEMAN et al., 2000). Na ausência do hormônio, a proteína CTR1 (*Constitutive Triple Response 1*), localizada a jusante dos receptores na via de sinalização bloqueia os elementos reguladores EIN 2 (*Ethylene Insensitive 2*), desativando a resposta ao etileno, atuando como um regulador negativo da rota (GAO et al., 2003; KIEBER et al., 1993). Entretanto, quando o etileno liga-se aos receptores (Figura 8), estes sofrem alterações conformacionais de modo que interagem com a cinase *Raf-like* CTR1. Essa ligação remove a supressão causada pela CTR1 e ativa EIN2, proteínas transmembranas chaves que atuam como reguladores positivos na via.

A cascata de transdução de sinal segue com a ativação de EIN3 (ALONSO et al., 1999; STEPANOVA; ALONSO, 2005). EIN3 são fatores de transcrição localizados no núcleo das células e ligam-se a genes que possuem uma região denominada elemento primário de resposta ao etileno (PERE). A sequência PERE foi encontrada no promotor do gene ERF1 (*Ethylene Response Factor 1*), o qual pertence a família dos genes ERFs. Essa região promotora pertence a uma grande família de fatores de transcrição conhecidas como proteínas de ligação de elementos em resposta ao etileno (EREbps) (RIECHMANN; MEYEROWITZ; 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).

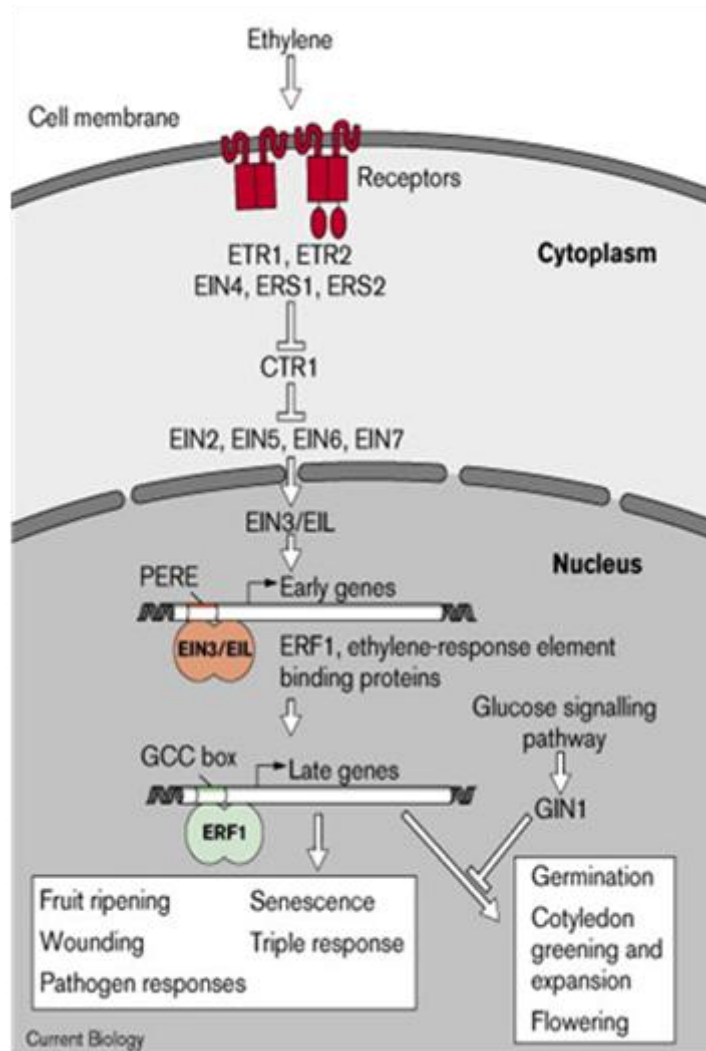


Figura 8: Modelo para via de sinalização que regula respostas das plantas ao etileno: sequência dos receptores envolvidos com a percepção e transdução de sinais (Theologis, 1998)

As respostas das plantas ao etileno podem ser reguladas pela (i) inibição da síntese desse fitormônio, (ii) através do bloqueio da ligação do etileno aos receptores ou (iii) bloqueando a reação da planta para ligação do etileno ao receptor (Figura 9). Determinados fatores ambientais são conhecidos por bloquear a percepção da planta ao etileno, regulando respostas a esse hormônio. Concentrações elevadas de CO<sub>2</sub> e baixas de O<sub>2</sub> suprimem a atividade da sintase do ACC e do ACO, respectivamente (SEREK et al., 2006). Baixas temperaturas são conhecidas por reduzir os efeitos do etileno possivelmente por diminuir a afinidade do hormônio ao receptor. Em flores de cravo foi constatado que para cada 10 °C de redução na temperatura as respostas ao etileno diminuiriam em cerca de 10 vezes, causando a redução na afinidade com os sítios de ligação (WOLTERING; HARKEMA, 1987). A manipulação genética com alvo nas etapas de biossíntese e percepção do etileno permitiu através de técnicas moleculares desenvolver plantas com a redução da produção e sensibilidade ao etileno (FRELLO et al., 2002; HUA et al., 1995; SRISKANDARAJAH et al., 2001; WILKINSON et al., 1997). Além disso, nas últimas três décadas diversos antagonistas do etileno foram descobertos e, alguns, utilizados por indústrias para reduzir os efeitos desse hormônio especialmente sobre plantas ornamentais e produtos pós-colheita (SEREK; ANDERSEN, 1993; SEREK et al., 2006). Dentre as substâncias químicas utilizadas, os inibidores da síntese do etileno que bloqueiam a conversão da SAM em ACC mostraram-se eficazes (SEREK et al., 2006). Entretanto, os inibidores da ação do etileno apresentam eficiência superior, pois protegem ao nível de receptor contra os efeitos de etileno provenientes de vias endógenas ou exógenas (SEREK; REID, 1993; SEREK et al., 2006).

Process	Chemical/ environmental inhibition	Molecular genetic inhibition
ACC synthase (ACS)	AVG AOA High CO <sub>2</sub>	Antisense ACS Co-suppression ACS
↓		
ACC		Heterologous expression of bacterial ACC deaminase
↓		Antisense ACO Co-suppression ACO
ACC oxidase (ACO)	CoCl <sub>2</sub> Alpha-aminoisobutyric acid Low O <sub>2</sub> concentration High temperature	
↓		
Ethylene gas	Removal by ventilation Chemical removal with KMnO <sub>4</sub> Absorption by zeolites	
↓		
Receptor	STS 2,5-NBD DACP 1-MCP, CP 3,3, DMCP 3-MCP 1-DCP, 1-HCP	Expressin of mutated ethylene receptor ( <i>etr1-1</i> )
↓		
Responses	Low temperature Cytokinin	Expression IPT gene from <i>Agrobacterium tumefaciens</i>

Figura 9: Métodos de inibição dos efeitos do etileno nas plantas por abordagens ambientais, moleculares e químicas (Serek et al., 2006).

## 2.8 1-MCP: inibidor da ação do etileno

O 1-metilciclopropeno (1-MCP) é um regulador do crescimento vegetal indicado para controlar os efeitos do etileno pela inibição da ação deste fitormônio (BLANKENSHIP; DOLE, 2003; KAWAKAMI et al., 2006; VAN STADEN, 1979). Em condições de temperatura e pressão ambiente o 1-MCP é um composto volátil com fórmula  $C_4H_6$  e massa molar de 54 g, caracterizado como uma molécula gasosa inodora, incolor, não tóxica e não geradora de resíduos detectáveis (BLANKENSHIP, 2001; SEREK et al. 1995; WATKINS, 2002, 2006). Este produto é formulado como um composto sólido (pó) que ao ser hidratado libera o gás que irá penetrar no tecido da planta. A preparação deve ser realizada no momento do uso e com o mínimo de agitação a fim de evitar perda da ação do produto (BLANKENSHIP, 2001; BURNS, 2008).

O 1-MCP é classificado como ciclopropeno, sendo esta classe de compostos derivados da degradação do diazociclopentadieno (DAP), um conhecido inibidor da ação do etileno (JOHNSON, 1987; SISLER; SEREK, 1999; SISLER et al., 1996;). Dentre os ciclopropenos, o 1-MCP tem sido amplamente utilizado em virtude da alta eficiência em reconhecer e ligar-se aos receptores de etileno, tornando-se uma ferramenta valiosa para o controle das respostas fisiológicas das plantas ao etileno (BURNS, 2008; SISLER; SEREK, 1997). A capacidade em minimizar os efeitos do etileno favoreceu a ampla utilização do 1-MCP em diversos setores agrícolas como horticultura e floricultura, principalmente na etapa de pós-colheita, retardando a ação desse hormônio sobre o amadurecimento de frutos e na senescência e abscisão flores. Nesses casos, o 1-MCP contribui para prolongar a oferta, qualidade e tempo de prateleira de uma variedade de produtos como, tomate, banana, maçã e ameixa, estendendo também a vida útil de plantas ornamentais após a colheita (BLANKENSHIP; DOLE, 2003; HOEBERICHTS et al., 2002; SCARIOT et al.,



2014; SKOG et al., 2001; WATKINS, 2006). Na pré-colheita, o 1-MCP foi utilizado para reduzir o desfolhamento de plantas de citrus tratadas com etileno exógeno para maturação dos frutos (BURNS, 2008).

A eficácia inibitória do 1-MCP deve-se, em particular, a afinidade de ligação dez vezes maior quando comparado ao etileno, mantendo-se ligado ao sítio receptor por tempo indeterminado. Com efeito, este composto é ativo em baixas concentrações uma vez que apresenta uma meia vida de difusão entre sete e doze dias enquanto que para o etileno a duração varia entre dois a dez minutos (BLANKENSHIP; DOLE, 2003; PEREIRA; BELTRAN, 2002). O controle químico do etileno ocorre pela ligação competitiva do 1-MCP aos receptores de etileno nas membranas celulares (BLANKENSHIP; DOLE, 2003; WATKINS, 2008). A junção do 1-MCP ao sítio para receptores de etileno é permanente, bloqueando a ligação do etileno e impedindo a sinalização para desencadear reações químicas no tecido vegetal (Figura 10). Portanto, o 1-MCP “desliga” os receptores, de modo que, nenhum sinal químico é emitido para as células, silenciando as respostas ao etileno.

No entanto, novos receptores podem ser sintetizados acarretando na retomada da sensibilidade da planta ao etileno (BLANKENSHIP, 2001; HALL et al., 2000; SISLER, 2006). Ainda que já estabelecido que o 1-MCP possui eficácia sobre baixas concentrações, sua ação efetiva pode variar de acordo com a espécie ou a cultivar (BLANKENSHIP; DOLE, 2003; HOFFMAN, 2001). Alguns autores afirmam existir relação entre concentração, tempo e temperatura, de modo que, em baixas temperaturas o 1-MCP pode não ser eficiente, possivelmente em função da baixa sensibilidade ao etileno (BLANKENSHIP; DOLE, 2003; JIANG et al., 2002). De modo geral, a concentração do produto utilizado deve ser suficiente para saturar os receptores, competindo com as moléculas de etileno presente (VILAS BOAS, 2002).

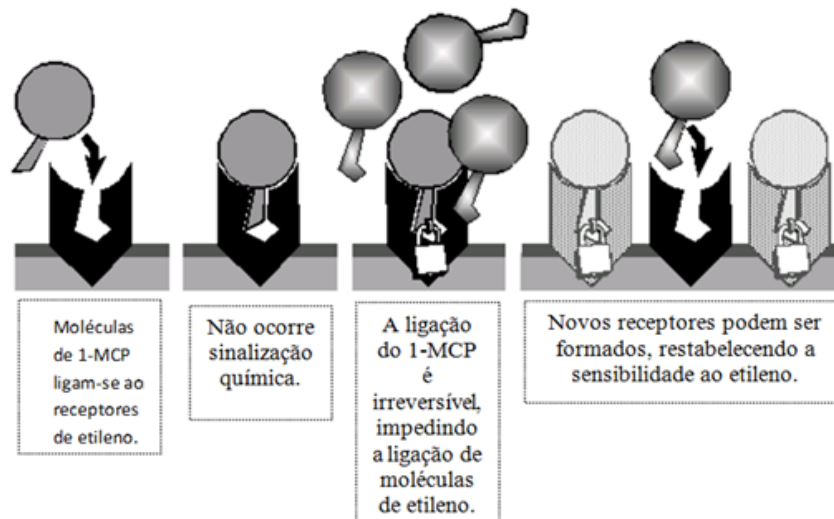


Figura 10: Ligação competitiva do 1-metilciclopropeno (1-MCP) aos receptores de etileno associados às membranas celulares (Adaptado de Blankenship, 2001).

## 2.9 Surfactante Break-Thru

Os surfactantes são substâncias utilizadas para pulverizar formulações, sobretudo na agricultura, aumentando a eficiência da deposição e absorção de moléculas ou compostos químicos, otimizando o efeito destes sobre as plantas (VERA-NÚÑEZ et al., 2010; RAMSEYA et al., 2005). A atividade eficaz dos surfactantes resulta da presença de agentes tensoativos na formulação, reduzindo a superfície de contato onde os surfactantes aplicarão a tensão. Esse efeito promove a penetração das moléculas de interesse, minimizando a perda do ingrediente ativo (NITSCHKE; PASTORE, 2002; SPRANKLE et al., 1975).

O Break-Thru é um surfactante organossiliconado, definido como super espalhante (Figura 11) e que possui como principal agente de funcionamento o

poliéter-polimetilsiloxano-copolímero (COMPENDIUM, 2013ab). Em virtude desse efeito, é amplamente utilizado para reduzir a tensão superficial das soluções pulverizadas, elevar o molhamento das folhas e aumentar a absorção do ingrediente ativo de interesse (SIEVERDING et al., 2006). Os surfactantes organossiliconados destacam-se por promover a absorção quase que instantânea através dos estômatos, impedindo que ocorra perda do produto pela chuva (BAYLES, 2014). Além disso, possuem toxicidade reduzida contribuindo para redução no impacto ambiental e principalmente, da dose do ingrediente ativo a ser utilizado (AGROW, 2014; HILL, 2006).



Figura 11: Espalhamento e cobertura uniforme promovida pelo Break-Thru S240 (Evonik, 2013, 2014)

Uma parcela considerável dos surfactantes não é capaz de reduzir a tensão superficial e promover a infiltração do produto via estômato, por isso, atuam aumentando a penetração através das cutículas. Nesse contexto, os surfactantes a base de organossilicone são mais eficientes, pois além de permitir a penetração cuticular, favorece o fluxo da solução pulverizada por meio do poro estomatal (Figura 12), contribuindo para elevação da translocação do produto aplicado (KNOCHE, 1994; PEREIRA, 2010). Essa classe de surfactantes, que tem como representantes o Break-Thru S240 e Silwet-L77 são os únicos capazes de minimizar a tensão superficial entre a solução aquosa de aproximadamente

73-76 mN/m a 22mN/m promovendo a fluidez estomatal (EVONIK, 2014; XU et al., 2011).

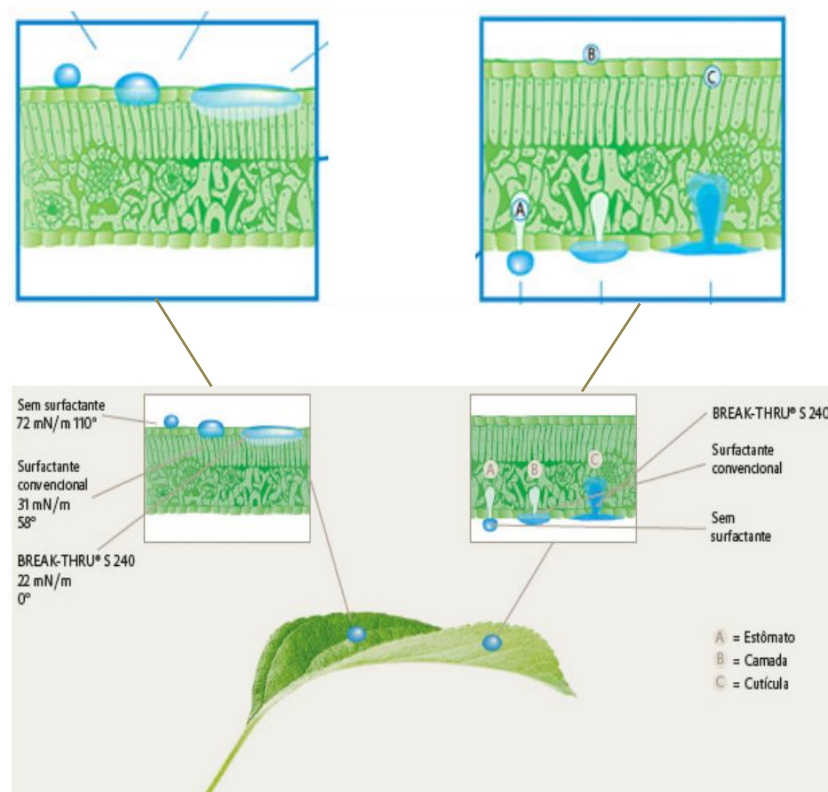


Figura 12: Representação da fluidez estomatal prometida por surfactantes organossiliconados como Break-Thru S240 na superfícil adaxial (a) e abaxial (b) da folha (Adaptado de Evonik, 2014)

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local, Período Experimental e Material vegetal**

O experimento foi conduzido na Fazenda Cafuá no município de Ijací – Minas Gerais, sendo implantado no dia 24 de setembro de 2015. O período experimental correspondeu aos dias 25 de setembro à 05 de outubro de 2015, utilizando-se plantas de cinco anos de idade da cultivar Catuaí Vermelho IAC 144. As demais análises foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas (LFMP) (<http://www.dbi.ufla.br/lfmp/>), no Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG – Brasil.

#### **3.2 Tratamentos e Delineamento Experimental**

O experimento foi composto por um grupo controle, sem aplicação dos produtos, e dois grupos tratados (Tabela 1). Para o grupo tratado com 1-MCP (3,8% de ingrediente ativo (i.a) – produto comercial Harvista<sup>TM</sup> - AgroFresh) diluiu-se 50 mg de i.a. em 1L de água para cada planta (LIMA, 2015). Nesse tratamento foi adicionado o Break-Thru (surfactante de organosilicone - S240, Evonik Industries AG, Essen, Alemanha) na concentração de 0,025 V/V. Visando otimizar a pulverização, as soluções foram preparadas a cada 3L de água. Para o grupo tratado apenas com Break-Thru, adicionou-se o produto na concentração descrita para o T2, seguindo também o mesmo padrão para preparo.

**Tabela 1:** Grupos de tratamentos do experimento para cv. Catuaí 144.

<b>Tratamentos</b>	<b>Descrição</b>	<b>Abreviação</b>
<b>T 1</b>	Controle	CTL
<b>T 2</b>	1-MCP + Break-Thru	1-MCP+BTH
<b>T 3</b>	Break-Thru	BTH

A pulverização das plantas ocorreu no dia 25 de setembro no período da manhã, entre 8 e 9 horas, com o auxílio de um pulverizador costal de 12L (S12 - Brudden Pulverizadores) logo após a preparação das soluções. Aplicou-se, inicialmente, o Break-Thru nas plantas do T3 e em seguida, o 1-MCP + Break-Thru nas plantas do T2. Para ambos, a pulverização foi efetuada na planta inteira abrangendo folhas (região adaxial e abaxial) e gemas.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com 3 tratamentos e 6 repetições biológicas, totalizando 18 plantas no experimento. Três linhas, aqui denominadas blocos, agruparam as repetições biológicas e entre cada bloco existia uma linha de plantas que atuou como bordadura. A localização das repetições biológicas nos blocos ocorreu aleatoriamente, preservando-se um espaço considerável entre cada planta para que não houvesse interferência entre os tratamentos (Figura 13).



Figura 13: Croqui do experimento conduzido com *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelha 144. Observa-se que o espaçamento real entre as plantas tratadas foi superior ao representado nesta figura. (T = Tratamento; R= Repetição biológica).

### 3.3 Coleta do Material

O material vegetal foi coletado de ramos plagiotrópicos, preferencialmente, no terço médio das plantas. Para análise do Teor Relativo de Água (TRA), coletou-se folhas completamente expandidas 2, 6, 24, 30 e 48 horas após a aplicação dos produtos. O material foi acondicionado em sacos de alumínio e mantidos no gelo até a realização das análises em laboratório, a fim de evitar perda de água ou interferência de outros fatores ambientais.

Para a análise da expressão gênica, coletou-se folhas completamente expandidas localizadas no 3º e 4º nós, e gemas a partir no estágio G4, de acordo com Morais et al. (2008). O material coletado foi mantido em nitrogênio líquido, e em seguida armazenado em freezer -80°C até o momento das análises.

### **3.4 Análises Fisiológicas**

#### **3.4.1 Trocas gasosas**

As determinações de trocas gasosas foram realizadas em dias tipicamente claros, no 3º ou 4º pares de folhas completamente expandidas em ramos plagiotrópicos localizados no terço médio das plantas, realizando três medições por planta utilizando-se um sistema aberto portátil de trocas gasosas, IRGA (*Infra Red Gas Analyzer*) modelo Li-6400 (Licor Inc., Nebraska, USA). As variáveis avaliadas foram: taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (gs) e transpiração (E).

As análises foram realizadas 2, 24 e 48 horas após a pulverização dos produtos, empregando-se as seguintes condições nas avaliações: saturação luminosa ( $1000 \mu\text{mol fóton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), temperatura ambiente,  $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$  no período das 9h00 às 11h00.

#### **3.4.2. Teor Relativo de Água (TRA)**

O teor relativo de água foi determinado através de 10 discos foliares, de  $1 \text{ cm}^2$  cada, retirados do limbo foliar (evitando-se a nervura central), segundo o método descrito por Silveira et al (2009).

Inicialmente, os discos foram pesados em balança analítica para obtenção da Massa Fresca (MF). Em seguida, foram acondicionados em placa de



Petri contendo papel de filtro saturado com água destilada durante 24h. Após esse período, os discos foram pesados para determinação da Massa Túrgida (MT). Finalmente, foram colocados em sacos de papel e mantidos em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C durante 2 dias, obtendo-se Massa Seca (MS). De posse dos dados, o TRA foi determinado pela seguinte equação, cujos resultados foram expressos em valores percentuais:

$$\text{TRA (\%)} = \frac{MF-MS}{MT-MS} \times 100$$

### **3.5 Análises Estatísticas**

Os dados foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e a significância estatística dos resultados foi analisada pelo Teste F. As médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

### **3.6 Análises moleculares**

#### **3.6.1 Extração de RNA**

Inicialmente, folhas e gemas foram maceradas em cadinho utilizando nitrogênio líquido, armazenando-se 100mg (0,25ml) de material vegetal para extração de RNA em tubos tipo eppendorf de 1,5ml. Para extração, utilizou-se o Protocolo do Concert (Plant RNA Purification Reagent - Invitrogen, USA), com pequenas alterações.

Adicionou-se 600  $\mu\text{L}$  de Concert ao material macerado, levando-se ao vórtex para homogeneização por 2 minutos. Os tubos foram mantidos na posição horizontal por 10 minutos á temperatura ambiente e posteriormente centrifugados a 14.800 rpm por 10 minutos a 4°C. Em seguida, coletou-se 450  $\mu\text{L}$  e 420  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de folhas e gemas, respectivamente, transferido-os para um novo tubo. Adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de NaCl 5M e 300  $\mu\text{L}$  de clorofórmio, subsequentemente levou-se os tubos ao vórtex por 1 minuto e a centrifugação a 14.800 rpm por 10 minutos a 4°C. Novamente, coletou-se o sobrenadante nos volumes de 400  $\mu\text{L}$  e 370  $\mu\text{L}$  para folha e gema, respectivamente, transferindo-os para novos tubos. Mais uma vez, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de NaCl 5M e 300  $\mu\text{L}$  de clorofórmio, repetindo-se as etapas da homogeneização em vórtex e centrifugação citadas anteriormente. Coletou-se 280  $\mu\text{L}$  e 320  $\mu\text{L}$  do sobrenadante, respectivamente para gemas e folhas, transferindo-os para novos tubos. Para as amostras de gemas foi necessário realizar essa etapa uma terceira vez, onde foi coletado 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante. Foi feita a adição de Isopropanol na mesma proporção Volume/Volume ao sobrenadante e as amostras foram homogeneizadas por meio de cerca de 15 inversões, em seguida, os tubos foram colocados em freezer -20°C durante 1 hora para precipitação do RNA. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14.800 rpm por 25 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e 600  $\mu\text{L}$  de etanol 75% foram adicionados ao pellet, e as amostras foram centrifugadas a 14.800 rpm por 5 minutos a 4°C. Descartou-se o etanol cuidadosamente e os tubos foram mantidos abertos até o etanol secar completamente. Após a secagem, o RNA foi ressuscitado com 20  $\mu\text{L}$  de água miliQ autoclavada. As amostras foram estocadas em freezer -20°C até a realização das futuras análises.

Após a extração do RNA, as amostras foram analisadas quanto à quantidade e qualidade utilizando-se um espectrofotômetro Nanovue® (NanoVue GE Healthcare). Utilizou-se 2  $\mu\text{L}$  de cada amostra para realizar essa

análise, observando-se a concentração do RNA e as relações de pureza  $A_{260}/_{280}$  e  $A_{260}/_{230}$ , priorizando, preferencialmente, valores entre 1,8 a 2,0. 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).

### 3.6.2 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 foi adicionado em cada amostra e as mesmas foram homogeneizadas, mantendo-se por 5 minutos a temperatura ambiente, e finalmente centrifugadas a 10.000 g por 2 minutos. Coletou-se, cuidadosamente, 15 µL do sobrenadante transferindo-os para novos tubos de 0,2 mL. 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.

### 3.6.3 Síntese de cDNA

Após a extração do RNA e do seu tratamento com DNase, as amostras apresentando alto grau de integridade e pureza foram utilizadas para a síntese de cDNA utilizando o Kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Em tubos de 0,2 mL, 1 µg de RNA tratado com DNase foi utilizado, completando-se o volume para 10 µL com água comercial livre de RNase e demais contaminantes. 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), foi adicionado em cada reação, resultando em um volume final de reação de 20 µL. Subsequentemente, 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.

### 3.6.4 Análise da expressão gênica por RT- qPCR

A análise da expressão dos genes relacionados com a síntese e sinalização do etileno (*CaACO1 – like*, *CaACO4 – like*, *CaACS1 – like*, *CaETR4 – like*) 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 a 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 (2, 6 e 24h), 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  $\Delta\Delta C_T$ , de acordo com Pfaffl (2001), utilizando os genes de referência AP47 e RPL39 (BARRETO, resultados não publicados). A diferença relativa da expressão de cada gene foi feita 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	Primer Forward (5' para 3')	Primer Reverse (5' para 3')	Eficiência de amplificação (%)
<i>CaACO1 - like</i>	ACGTGGAAGCCAATGTTACC	GAGGGAGAAGAAAACATCCTAGC	96
<i>CaACO4 - like</i>	CGCAACTGTTTGAGATCACG	CCAATCCAAGCATTAACAAGG	95
<i>CaACS1 - like</i>	TCCTTACCATCCCACCAGAA	CCATGAATTTGTTTCGCTCCT	90
<i>CaETR4 - like</i>	TTGGTCCATTCAGGAACTCG	GCATCCTGTTTTGCTTGTTG	85
<i>AP47</i>	GGTGTACGCTCACCATTTTCATC	AGCCAACAGCACCAGTAACTTG	99
<i>RPL39</i>	GCGAAGAAGCAGAGGCAGAA	TTGGCATTGTAGCGGATGGT	87

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.2 Análises Fisiológicas

As plantas exibiram teor relativo de água foliar (TRA) entre 30 e 43% (Figura 14). Analisando os índices de TRA ao longo do tempo, observou-se diferença significativa entre os tratamentos apenas 6h após a pulverização com 1-MCP+BTH.

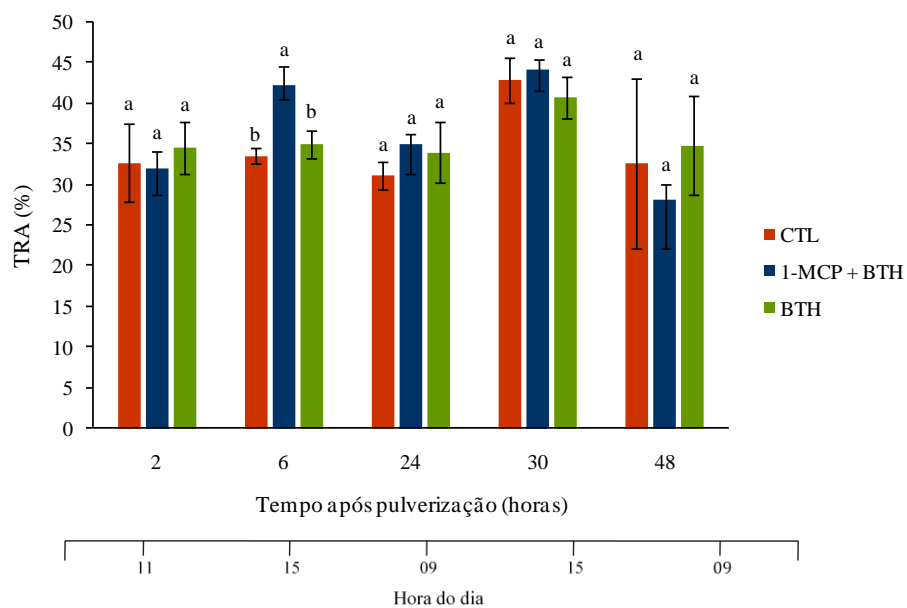


Figura 14: Teor Relativo de Água após aplicação dos tratamentos ao longo do tempo. Médias seguidas pelas mesmas letras comparando os tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). As barras indicam o erro padrão da média de seis repetições.

Muitos trabalhos fazem uso do TRA para determinação da condição hídrica do vegetal, e geralmente, o declínio nos níveis de TRA com valores abaixo de 50% são observados quando plantas são submetidas a deficiência hídrica (MASSON et al., 2015; VILELA, 2012; YAMASAKI; DILLENBURG, 1999). De acordo com Angelocci (2002), o TRA é considerado como a variação de massa de água do tecido proveniente da variação da massa de água celular e, conseqüentemente, da variação do volume da célula, comparando-se o estado máximo e a perda da turgescência. Portanto, o acompanhamento do status hídrico foliar do cafeeiro neste trabalho possibilitou observar que a turgescência celular não se encontrava no estado máximo uma vez que o volume de água na célula encontrava-se reduzido.

Possivelmente os índices de precipitação (APÊNDICE B) registrada nas condições de campo em que este experimento foi realizado parecem ter conduzido os cafeeiros a uma situação de limitação hídrica. Contudo, em virtude de o cafeeiro ser considerado uma espécie relativamente tolerante à seca (MAZZAFERA; CARVALHO, 1987) e a cultivar Catuaí Vermelho ser caracterizada como tolerante a períodos de estiagem (MATIELLO et al., 2009), não foi identificado sintomas de murcha nas folhas ou qualquer outro sintoma visível relacionado com a baixa disponibilidade de água.

No presente trabalho, os valores de TRA abaixo de 50% provavelmente estão relacionados com o horário do dia em que as coletas foram realizadas. As coletas nos respectivos horários foram realizadas com o intuito de verificar possível influência dos produtos no TRA ao longo do tempo, considerando especialmente os tempos onde foram avaliados os parâmetros de trocas gasosas. No entanto, o aumento nas taxas de radiação solar incidente e temperatura nesses horários, principalmente às 15h, certamente afetaram o teor de água foliar, uma vez que esses fatores determinam em maior ou menor intensidade a taxa de vapor de água liberada pelo vegetal. Um fato interessante é que as



plantas tratadas com 1-MCP+BTH exibiram suave aumento no TRA 6h após a pulverização, coincidindo com às 15h do dia. Isto sugere que o 1-MCP associado com o BTH proporcionou um pequeno aumento no teor de água foliar, que pode ter contribuído para melhorar o condicionamento hídrico da planta. Tendo em vista a importância da água para realização dos processos biológicos, um aumento na quantidade de água pode ter favorecido as reações bioquímicas, as quais ocorrem em meio aquoso, além de contribuir com uma maior quantidade de água que ficaria disponível para fluir para as gemas.

Quanto á condutância estomática ( $g_s$ ), houve queda significativa nos tratamentos com 1-MCP+BTH e BTH, de modo que, plantas tratadas com 1-MCP+BTH apresentaram valores abaixo de  $0,04 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  em todos os tempos avaliados. Os níveis de  $g_s$  das plantas controles mantiveram-se sempre acima desse limiar, sendo duas vezes superior no tempo 48 (Figura 15). De modo geral, os níveis de  $g_s$  do tratamento controle diferiram significativamente e conservaram-se superiores aos níveis de  $g_s$  verificados nas plantas dos tratamentos com 1-MCP+BTH e BTH no decorrer das avaliações. Logo após 2h das pulverizações, a  $g_s$  das plantas tratadas com 1-MCP+BTH e BTH foram cerca de três vezes inferior em comparação com o controle, e após 48h, a diferença entre o controle e o tratamento com 1-MCP+BTH foi cerca de 5 vezes. Entre os tratamentos do 1-MCP+BTH e BTH não houve diferença significativa em qualquer um dos tempos avaliados.

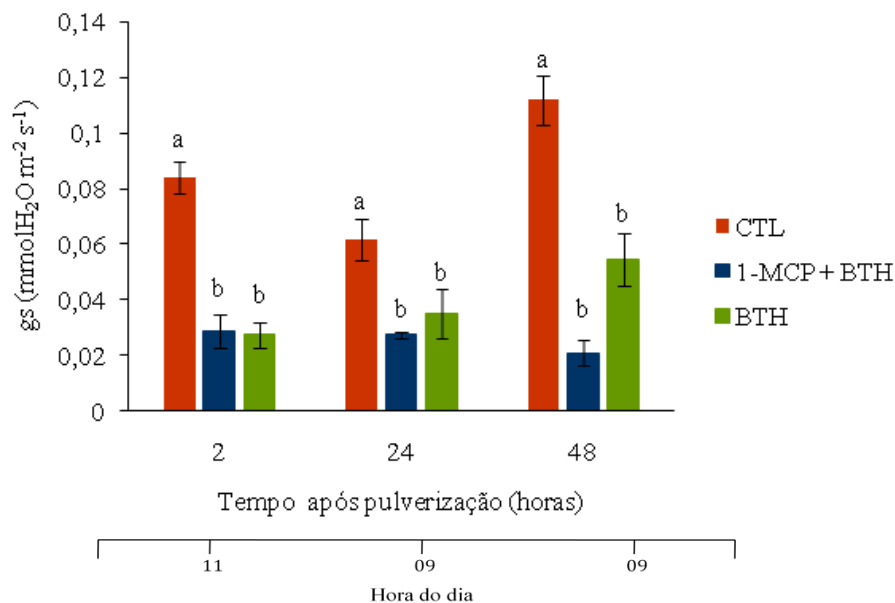


Figura 15: Condutância estomática (gs) ao longo do tempo em resposta aos diferentes tratamentos. Médias seguidas pelas mesmas letras comparando os tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). As barras indicam o erro padrão da média de seis repetições.

Com relação à taxa fotossintética líquida ( $A$ ), após 2h da implementação dos tratamentos, foi possível observar que não houve diferença entre as plantas tratadas com 1-MCP+BTH e BTH (Figura 16). Nesses tratamentos, a taxa de assimilação de carbono foi significativamente diferente (cerca de duas vezes inferior) em relação às plantas do controle, que apresentaram  $A$  acima de  $7 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . No decorrer das avaliações (2h, 24h e 48h após as pulverizações) a similaridade da fotossíntese líquida entre nos tratamentos do 1-MCP+BTH e BTH foram mantidas, assim como a diferença desses tratamentos quando comparados com o tratamento controle. Como previsto, houve estreita relação entre os níveis de  $g_s$  e  $A$  nos três tempos avaliados. Presume-se que é comum

que as taxas fotossintéticas sejam afetadas pela condutância estomática, tendo em vista que a redução na abertura da fenda estomática compromete o influxo de  $\text{CO}_2$  para o interior da câmara subestomática (ANDRADE, 2011), mostrando a relação entre o grau de abertura estomática e a taxa de fotossíntese (RODRIGUES, 2013). Portanto, existe relação entre essas variáveis de forma que a regulação da condutância estomática tem sido referida como principal componente responsável por limitar a fotossíntese (CORNIC, 2000).

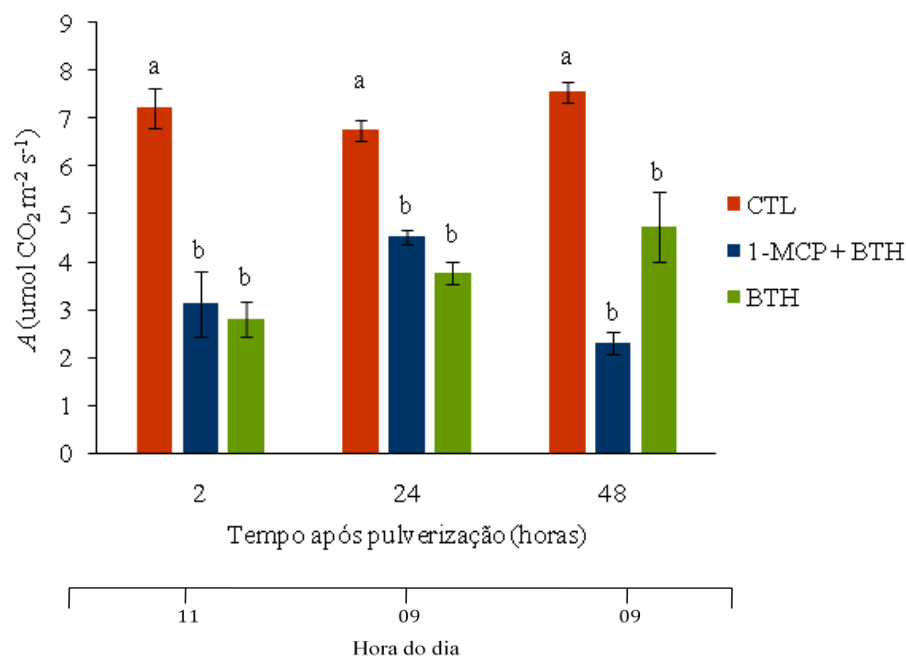


Figura 16: Taxa fotossintética líquida ( $A$ ) ao longo do tempo em resposta aos diferentes tratamentos. Médias seguidas pelas mesmas letras comparando os tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). As barras indicam o erro padrão da média de seis repetições.

Analisando a taxa de transpiração ( $E$ ) (Figura 17), as plantas que receberam tratamento com 1-MCP+BTH e BTH responderam de forma análoga

a  $g_s$  e  $A$  apenas após 2h. Nesse caso, foi verificado declínio na  $g_s$ , reduzindo a perda de água por transpiração, mas conseqüentemente, também restringiu o suprimento de  $CO_2$ , afetando negativamente a fotossíntese. Existe uma dependência entre  $E$  e  $g_s$ , de modo que o fechamento parcial dos estômatos conservam a água no interior da planta reduzindo o risco de desidratação (BERGONCI; PEREIRA, 2002; TENHUNEN et al., 1987). Após 24h, não foi observada diferença entre os tratamentos, entretanto, com 48h houve aumento no nível de  $E$  nas plantas do controle e tratadas com BTH, enquanto que no tratamento com 1-MCP+BTH, as plantas mantiveram a taxa de transpiração reduzida.

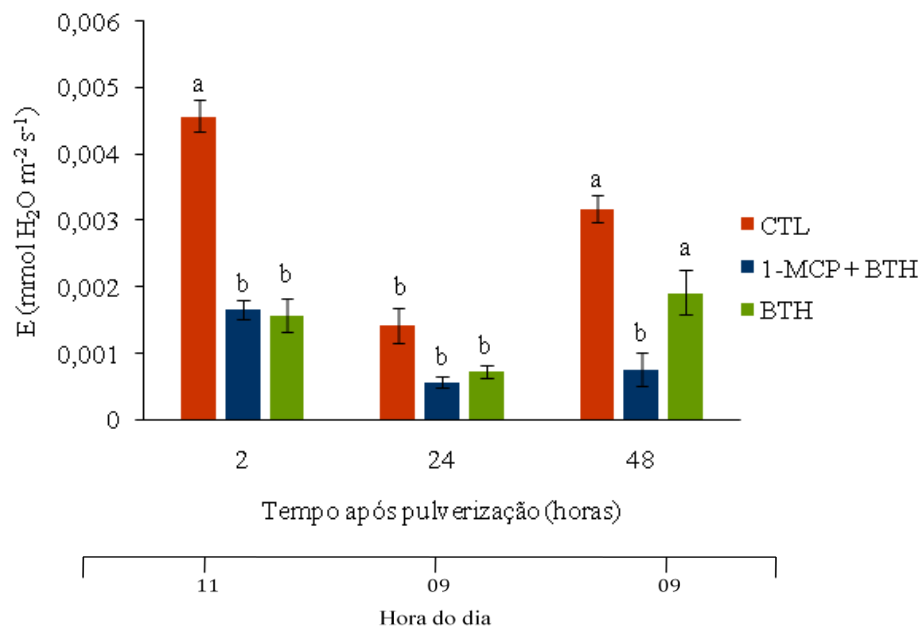


Figura 17: Taxa de transpiração ( $E$ ) ao longo do tempo em resposta aos diferentes tratamentos. Médias seguidas pelas mesmas letras comparando os tratamentos não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). As barras indicam o erro padrão da média de seis repetições.

Houve, nitidamente, influência dos tratamentos com 1-MCP+BTH e BTH nas trocas gasosas, acarretando na diminuição dos níveis de todas as variáveis. A taxa fotossintética líquida não foi comprometida nas plantas controle, considerando que os valores de  $A$  nessas plantas permaneceram dentro da faixa registrada para taxas fotossintéticas em cafeeiros, que de acordo com RENA et al. (1994) variam em torno de 7 a 12  $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Entretanto, valores de  $A$  entre 2 e 5  $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  só foram registrados nas plantas tratadas com 1-MCP e BTH. Isto mostra que a diminuição em  $A$  nessas plantas foi promovida pela pulverização desses produtos, os quais interferiram também no funcionamento estomático, limitando a assimilação do  $\text{CO}_2$  e a perda de água.

No estudo realizado por Lima (2015) com mudas de café em casa de vegetação, o tratamento com 1-MCP+BTH e BTH em plantas bem regadas resultou em taxas de  $g_s$  e  $A$  semelhante às mudas submetidas à deficiência hídrica, logo após 2h das pulverizações. Todavia, os efeitos observados nas mudas pulverizadas não foram duradouros, havendo recuperação nos níveis 24 e 48h depois, enquanto que sob déficit hídrico  $g_s$  e  $A$  permaneceram reduzidos. No entanto, ao contrário do que foi observado por esse autor, no presente trabalho os cafeeiros não apresentaram recuperação significativa nas taxas de  $g_s$  e  $A$  nos tempos 24 e 48. Essa manutenção dos baixos valores de  $g_s$  e  $A$  pode ter ocorrido, principalmente, em função da ausência de hidratação das plantas de café, o que pode ter contribuído para redução da abertura estomática limitando a fotossíntese. Além disso, fatores como a diferença na condição experimental, considerando a influência de variáveis ambientais, podem ter colaborado para retardar a retomada do funcionamento normal da planta.

Uma vez que houve influência dos produtos nas trocas gasosas, Lima (2015) sugeriu que esses efeitos resultavam da ação do surfactante Break-Thru, e que as alterações nos níveis dos parâmetros avaliados eram reforçadas pelo 1-

MCP. Deve-se mencionar que redução na taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> ocorreu após a aplicação de surfactantes de organossilicone (ORBOVIC et al., 2001), a exemplo do Break-Thru, e é muito provável que esse efeito tenha sido causado pela redução da abertura dos estômatos. Ainda nesse contexto de regulação estomática, foi atribuído a esse mecanismo a habilidade em elevar o potencial de água foliar (DODD et al., 2009; KUDOYAROVA et al., 2007) de modo que, o fechamento estomático pode ter conduzido a um aumento transitório no nível de água da parte aérea e contribuído para a antese no cafeeiro (LIMA, 2015).

Apesar de o fechamento estomático durante o dia não ter elevado o TRA acima de 50%, o tratamento do 1-MCP+BTH foi o único a apresentar aumento no teor de água foliar de forma significativa, ainda que momentaneamente. Também nesse tratamento, as taxas de transpiração mantiveram-se baixas, mesmo que diferença significativa só tenha sido observada após 48h, indicando que o 1-MCP realmente compromete as respostas fisiológicas do cafeeiro, e nesse aspecto, a redução na transpiração contribuiu para manter os níveis internos de água e parece ter sido suficiente para gerar um fluxo de água das folhas para os botões florais. Deve-se destacar, no entanto, que as alterações nos parâmetros de trocas gasosas não devem ser interpretadas como efeito negativo do produto, mas como ajustes que contribuíram no processo até a antese. Essa afirmação é validada uma vez que as plantas de ambos os grupos (controle e tratados) apresentavam as mesmas condições antes da implementação dos tratamentos (Figura 18), mas a promoção da antese ocorreu exclusivamente em cafeeiros tratados com 1-MCP+BTH (Figura 19), corroborando nesse aspecto com os resultados obtidos por Lima (2015). A antese ocorreu cerca de nove dias após a pulverização com 1-MCP+BTH em três das seis repetições biológicas (Figura 20) do Tratamento 2 (1-MCP+BTH). Para a repetição T2R2, o florescimento foi causado por uma pequena chuva dias antes da pulverização com 1-MCP. Em relação às repetições T2R1 e T2R3, possivelmente a primeira

florada ocorrida no início de setembro reduziu o número de gemas no estágio G4. Além disso, as coletas para as análises de expressão gênica foram realizadas, preferencialmente, com gemas no estágio G4. Assim, o método destrutivo da coleta contribuiu para diminuir a quantidade de gemas que estariam aptas para floração.

Acompanhando os valores diários de precipitação (APÊNDICE B), verifica-se que após o início do experimento ocorreram chuvas esporádicas de baixa intensidade (abaixo de 2,5mm). Portanto, não significativa e incapaz de desencadear a antese nas plantas durante a condução do experimento. Isto reforça, mais uma vez, a teoria de que a floração no Tratamento 2 (T2) foi desencadeada pelo 1-MCP e não induzida pela chuva.



Figura 18: Representação da condição fisiológica e fenológica em condição de campo das repetições biológicas antes da implementação dos tratamentos: (A) T 1 - Controle; (B) T 2 - 1-MCP+BTH; (C) T 3 - BTH.



Figura 19: Representação da condição fisiológica e fenológica em condição de campo das repetições biológicas após a implementação dos tratamentos: (A) T 1 - Controle; (B) T 2 - 1-MCP+BTH; (C) T 3 - BTH.



Figura 20: Antese ocorrida em plantas de café do tratamento com 1-MCP+BTH 9 dias após a pulverização.



Considerando que o 1-MCP funciona como inibidor da ação do etileno (BLANKENSHIP; DOLE, 2003), entende-se que existe uma relação entre o fitormônio etileno e o florescimento do cafeeiro. Porém, a forma como o etileno exerce regulação sobre o evento de floração nessa espécie ainda não está nítida. Lima (2015) propôs inicialmente duas hipóteses: i) o etileno atuaria como inibidor do florescimento, logo a aplicação do 1-MCP promoveria a antese; (ii) o etileno seria um indutor do florescimento e o uso do 1-MCP conduziria as plantas a autocatálise, acarretando no aumento dos níveis de etileno, promovendo a antese .

A respeito da floração do cafeeiro, sabe-se que a fase dormente coincide com um breve período de seca (SILVA, et al., 2009), e o reinício das chuvas promove a retomada do crescimento dos botões florais, após a quebra da dormência (REDDY, 1979). Em virtude da oscilação entre estresse hídrico e reidratação, a biossíntese, sinalização e o transporte dos fitormônios podem ser alterados (GOMEZ-CADENAS et al., 1996; MAHOUACHI et al., 2005). Dentre esses hormônios, alguns estudos constataram que durante um período de seca seguido por reidratação houve aumento nos níveis de etileno (BELTRANO et al., 1997; YANG et al., 2014) e conectando esse evento com o florescimento, em rosas a imposição de um déficit hídrico seguido por reidratação elevou os níveis de etileno e promoveu a antese (LIU et al., 2013). Embora outros autores relatem a redução nos níveis de etileno sob seca (LARRAINZAR et al., 2014; SCHUCH et al., 1992), Lima (2015) verificou em mudas de café que a reidratação após um período de restrição hídrica promoveu aumento na expressão de genes relacionados com a biossíntese e sinalização do etileno em folha e raiz, sendo que, um possível acúmulo do precursor do etileno (ACC) pode ter ocorrido nas raízes das mudas sob déficit hídrico. 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), embasando a hipótese de que durante o período seco, o ACC é acumulado nas raízes, e após chuva ou irrigação, é transportado para a parte aérea, elevando o nível de etileno nessa região e promovendo a antese no cafeeiro.

Como reportado, no presente trabalho as plantas tratadas com o inibidor da ação do etileno apresentaram abertura floral. O 1-MCP em alguns estudos atuou em concordância com a sua função, ou seja, regulou negativamente a expressão de genes da rota do etileno causando a redução nos níveis desse hormônio (BULENS et al., 2012; YANG et al., 2013). Contudo, Nakatsuka et al. (1998) observou resultado divergente para ação do 1-MCP, ao constatar que a aplicação desse composto elevou a expressão de genes envolvidos na síntese do etileno, e de acordo com Ella et al. (2003), após poucas horas da aplicação do 1-MCP em folhas de salsa ocorreu aumento instantâneo na biossíntese do etileno, sendo esse efeito justificado, possivelmente, em função da perda do *feedback* negativo da biossíntese do etileno.

#### **4.1 Análises da expressão dos genes**

A análise do perfil de expressão do gene *CaACSI-like* permitiu observar diferenças na expressão deste gene entre os tecidos de café avaliados (Figura 21). Em folhas, *CaACSI-like* apresentou nível de expressão semelhante entre controle e 1-MCP, diferindo apenas 6h após a pulverização das plantas. Em relação ao Break-Thru, somente após 2h ocorreu mudança significativa na expressão do *CaACSI-like*, sendo três e quatro vezes maior do que o 1-MCP e controle, respectivamente. A aplicação do 1-MCP promoveu um aumento na regulação desse gene 6 horas após a pulverização nas plantas, mostrando um aumento de duas e três vezes nos níveis de expressão quando comparado com os níveis de expressão do mesmo gene nos tratamento do Break-Thru e o Controle.

Decorrido 24h, não foi detectada diferenças entre os tratamentos. Nos tecidos de gema, não houve diferença na expressão do *CaACSI-like* entre o tratamento com 1-MCP e o controle após 2h. A diferença significativa na expressão foi observada somente após 6h, reduzindo na amostragem de 24h. Interessantemente, esse padrão de expressão após 6h foi análogo para ambos os tecidos. Nas gemas, o tratamento com Break-Thru apresentou aumento na expressão do *CaACSI-like* em cinco vezes quando comparado ao 1-MCP no tempo de 24h, mas não exibiram diferença em comparação com as plantas controle.

O gene *CaACO1-like*, análogo ao gene da oxidase do ACC, foi nitidamente mais expresso em folhas do que em gemas de café (Figura 21). Nas folhas, esse gene foi mais expresso a 2h após as pulverizações. As plantas tratadas com Break-Thru apresentaram expressão duas e dez vezes superior em relação aos tratamentos com 1-MCP e controle, respectivamente. Após 6h não houve diferença na expressão para os tratamentos com 1-MCP e Break-Thru, mas ambos expressaram o *CaACO1-like* 4 vezes mais que as plantas controle. Nota-se que ao longo do tempo, a expressão do *CaACO1-like* reduziu no tratamento com Break-Thru, e para o tratamento com 1-MCP, após 24h ocorreu um ligeiro aumento na expressão desse gene quando comparado com os demais tratamentos. Os níveis de expressão do *CaACO1-like* em gema foram extremamente baixos quando comparados com as folhas e semelhante em todos os tempos de amostragem, exceto no tempo 2 onde no tratamento com Break-Thru esse gene foi 2 vezes mais expresso em comparação com o tratamento do 1-MCP e do controle.

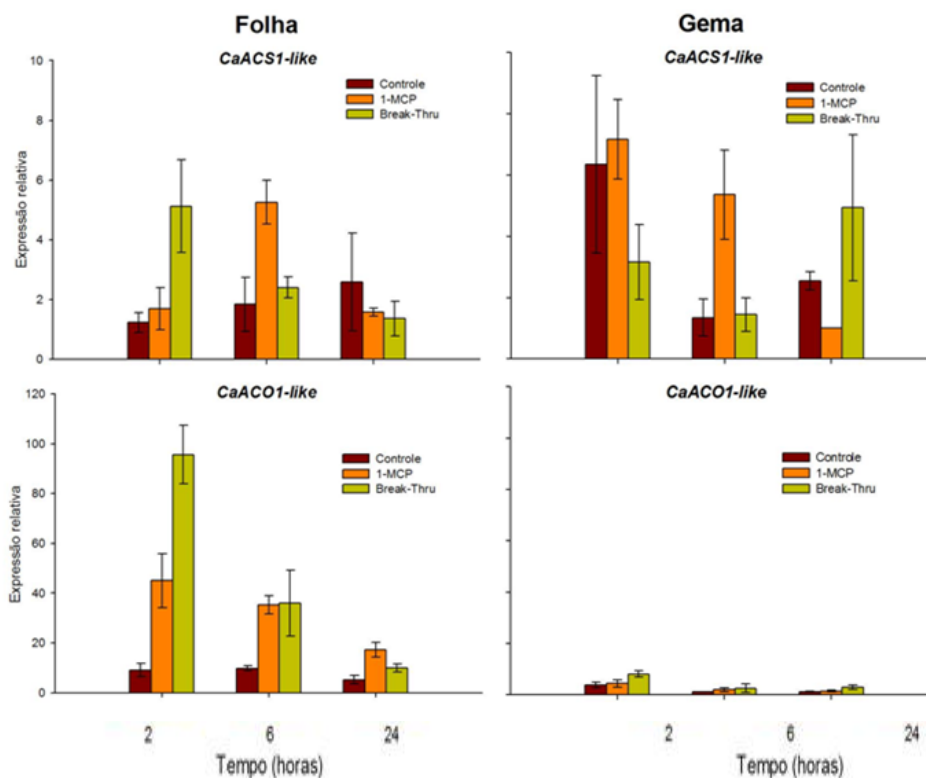


Figura 21: Expressão gênica relativa dos genes *CaACS1-like* e *CaACO1-like* em folhas (painel à esquerda) e gemas (painel à direita) de café nos tempos 2, 6 e 24 h após a implementação dos tratamentos: controle, 1-MCP+Break-Thru e Break-Thru.

O segundo gene análogo a oxidase do ACC, *CaACO4-like*, mostrou-se regulado diferencialmente entre os tecidos de folha e gema de café (Figura 22). Nas folhas, após 2h, o Break-Thru quatro vezes mais expresso que o controle e duas vezes mais expresso que o 1-MCP. 6h após as pulverizações, a expressão do *CaACO4-like* reduziu no tratamento do Break-Thru e aumentou ligeiramente no 1-MCP, ocorrendo o inverso após 24h. Nos tempos de 6h e 24h, os tratamentos do 1-MCP e Break-Thru não diferiram quanto a expressão do gene *CaACO4-like*. Em relação ao controle, apenas após 24h houve uma pequena diferença quando comparado aos demais tratamentos. Em gemas, somente 24h

após as pulverizações foi observada diferença na expressão do *CaACO4-like* entre os tratamentos. No tratamento do Break-Thru, esse gene foi cerca de três vezes mais expresso que o 1-MCP.

O perfil de expressão do gene *CaETR4 – like* (Figura 22) mostra que em folhas, 2h e 6h após as pulverizações, a expressão desse gene não diferiu entre o tratamento do 1-MCP e do Break-Thru, entretanto, em ambos os tempos houve expressão diferencial em comparação com o controle. Para o tempo de 24h, não houve diferença significativa na expressão do *CaETR4-like* entre os tratamentos. Em gemas, após 2h não houve diferença entre controle e o 1-MCP, mas ocorreu aumento significativo na expressão desse gene no 1-MCP em comparação com o controle após 6h. Contrariamente, com 24h após a aplicação a expressão do *CaETR4 – like* para o 1-MCP reduziu, de forma que a diferença entre os tratamentos não foi mantida.

Analisando os membros relacionados com a via de biossíntese do etileno, verificou-se que os padrões de expressão nos tecidos de gema e folha são distintos. No gene homólogo da sintase do ACC, *CaACSI-like*, o nível de expressão foi semelhante entre os tecidos analisados. Mas, um pico de expressão ocorreu nas gemas após 2h da pulverização sugere que nos botões florais a síntese do precursor do etileno (ACC) ocorre bruscamente e de maneira mais intensa, respondendo rapidamente ao 1-MCP. Quanto ao gene *CaACO4-like*, em gemas, houve super expressão em relação ao *CaACO1-like*, enquanto nas folhas a expressão desses genes foi semelhante. É interessante notar que os genes relacionados com a expressão da enzima oxidase do ACC foram mais regulados nas folhas após as pulverizações com 1-MCP+BTH e BTH. O aumento nos níveis de expressão de *CaACO1-like* e *CaACO4-like* em resposta a esses produtos sugere que ocorreram elevações nas taxas de etileno foliar, especialmente após 2 horas das pulverizações.

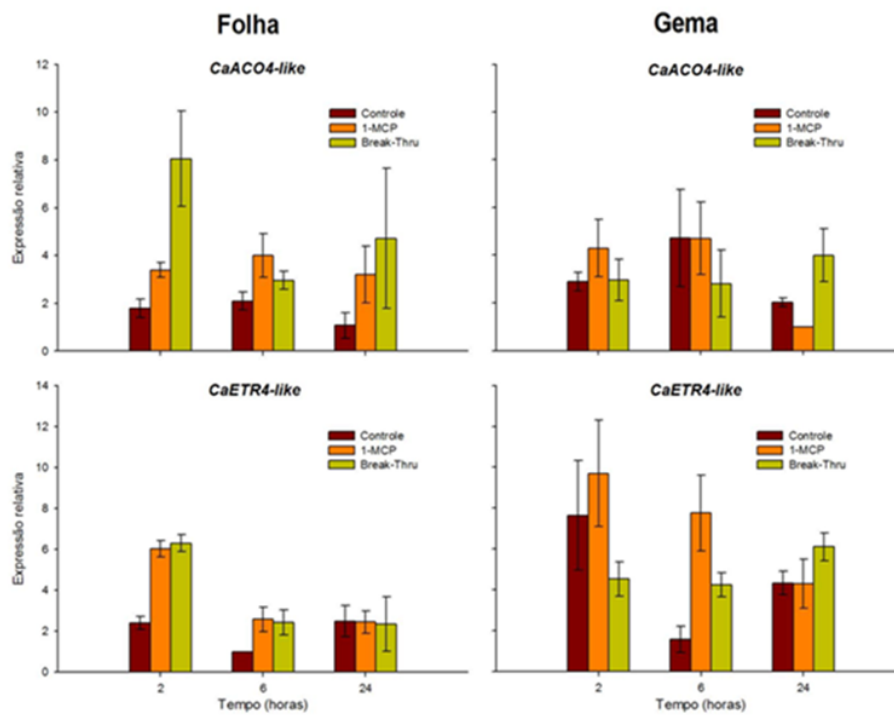


Figura 22: Expressão gênica relativa dos genes *CaACO4-like* e *CaETR4-like* em folhas (painel à esquerda) e gemas (painel à direita) de café nos tempos 2, 6 e 24h após a implementação dos tratamentos: controle, 1-MCP+Break-Thru e Break-Thru.

Esses resultados estão de acordo com a análise de expressão, para ambos os genes, realizada por Lima (2015) em folhas de mudas de café cultivadas em casa de vegetação. O autor relatou picos na expressão do *CaACO1-like* e *CaACO4-like* poucas horas após o início dos tratamentos com 1-MCP e BTH, assim como ocorrido neste estudo, mostrando que nas folhas a conversão do ACC em etileno, provavelmente, foi acentuada. Aparentemente, essa produção é súbita e transitória considerando que os níveis de expressão dos genes oscilaram rapidamente, geralmente apresentando intensidade e duração dos picos inferior a 24h. Outro fato interessante foi a baixa expressão do *CaACO1-like* em gemas

quando comparado com as folhas, principalmente nas plantas do controle, e apesar da aplicação dos produtos, o nível de expressão desse gene não foi significativo. Isto mostra que apenas uma das oxidases estudada está atuando nos botões florais, realizando a conversão do ACC em etileno. Com isso, esses resultados de expressão sugerem que um aumento nos níveis de etileno ocorra logo após as primeiras horas de aplicação do 1-MCP, considerando o perfil de expressão de todos os genes analisados neste estudo.

A expressão do gene *CaETR4-like*, homólogo ao receptor do etileno, apresentou expressão significativa em ambos os tecidos, embora em um nível muito maior nas gemas (figura 22). Inicialmente, este parece ser um resultado contraditório, uma vez que, um aumento na expressão de genes envolvidos com a via de sinalização e percepção do etileno diminuem a sensibilidade do tecido vegetal a esse hormônio, pois os receptores atuam como reguladores negativos de resposta ao etileno. Entretanto, deve-se ressaltar que o nível de transcrição de um gene nem sempre reflete a quantidade de proteína desse gene e, nesse contexto, Kevany et al. (2007) relataram que a existência de um mecanismo pós-transcricional seria a base para esse processo. Os autores verificaram aumento na expressão de genes relacionados com receptores de etileno em tomate, *LeETR4* e *LeETR6*, no entanto, não houve aumento na sensibilidade do tecido ao etileno, comprometendo o processo de maturação do fruto. Além disso, foi detectada diminuição na quantidade das proteínas desses genes quando o etileno ligava-se ao receptor, indicando que a degradação das proteínas resultavam do acoplamento entre o hormônio e o receptor.

Logo, concluiu-se que a capacidade da planta em responder ao etileno ocorre através de um fino ajuste entre o etileno e o receptor, considerando que a ligação do etileno desativa o receptor permitindo que a sinalização ocorra, enquanto que a ausência de etileno mantém o receptor ativo, e a cascata de sinalização desativada. No presente trabalho, possivelmente, a elevada expressão

do *CaETR4-like* não tornou os tecidos de folha e gema menos sensíveis e, conseqüentemente, menos responsivos ao etileno. A redução na repressão das respostas ao etileno podem ter sido geradas por mecanismos pós-transcricional, através do princípio da degradação das proteínas como relatado por Kevany et al. (2007).

As etapas de sinalização do etileno são reguladas por mecanismos de *feedback*, tornando o processo de sinalização dinâmico e complexo (CHEN et al., 2005; GUO; ECKER, 2004; KENDRICK; CHANG, 2008). Por exemplo, a presença de etileno nos tecidos induz a produção de etileno autocatalítica através de um *feedback* positivo (SEREK et al., 2006), onde o etileno produzido estimula ainda mais a atividade da sintase do ACC (JIANG; FUN, 2000), aumentando a concentração do hormônio na planta. De maneira similar, ocorre estímulo na produção de etileno através da perda do *feedback* negativo (WATKINS, 2006). Certamente, um mecanismo de *feedback* possa ser uma possível explicação para os resultados divergentes observados na expressão desses genes quando as plantas foram tratadas com 1-MCP Break-Thru, especialmente para o BTH que, surpreendentemente, exerceu grande influência na expressão gênica, obtendo algumas vezes nível de expressão superior ao 1-MCP.

Considerando que a ligação do 1-MCP estabiliza os receptores (KEVANY et al., 2007), ao ocupar os sítios de ligação do etileno essas moléculas podem ter induzido a interpretação pela planta de redução nos níveis de etileno celular. Assim, provavelmente o 1-MCP estimulou a autocatálise do etileno através da perda do *feedback* negativo, assim como descrito por Ella et al. (2003). Isto sugere que a ligação do 1-MCP bloqueou a sinalização na rota de biossíntese do etileno. Assim, os sinais que eram enviados para reduzir a síntese cessaram e a planta foi estimulada a produzir mais etileno, elevando a sensibilidade da planta ao hormônio. Conjuntamente, esses efeitos



provavelmente promoveram um aumento no nível e ação do etileno, culminando na antese dos botões florais competentes no cafeeiro (figura 20).

Quanto ao Break-Thru, a ação super espalhante e altamente adesiva na superfície foliar promoveu redução nos parâmetros fisiológicos, como mencionado anteriormente. Desse modo, o surfactante atuou como um agente estressor, expondo as plantas a uma situação adversa no que se refere ao funcionamento dos estômatos, diminuindo a abertura estomática e, conseqüentemente, reduzindo a fotossíntese e a taxa de transpiração (figura 15). Na maioria dos tecidos vegetais, baixos níveis de estresses estimulam aumentos transitórios nos níveis de etileno, com efeitos pouco duradouros (SALTVEIT, 1999). Possivelmente, essas alterações nos processos fisiológicos causadas pelo Break-Thru contribuíram para elevar a expressão dos genes envolvidos com a biossíntese do etileno, a partir de um mecanismo de *feedback* positivo. Interessantemente, esse aumento ocorreu de maneira mais intensa nas folhas, possivelmente por apresentar maior superfície de contato do que as gemas (figura 22). Essa constatação sustenta a hipótese do Break-Thru ter atuado como um composto causador de estresse e o aumento na taxa de produção do etileno, e nesse caso, a regulação ocorreu como um mecanismo de defesa da planta.

## 5 CONCLUSÕES

A aplicação do Break-Thru e 1-MCP causaram interferência sobre os parâmetros de trocas gasosas, promovendo redução na condutância estomática e, conseqüentemente, reduzindo as taxas de fotossíntese e transpiração. Em relação ao TRA, apenas o tratamento com 1-MCP+BTH contribuiu para elevar o teor de água foliar. Os resultados sugerem que a interação desses fatores contribuiu para regular a expressão dos genes da rota de biossíntese e sinalização do etileno.

O aumento nos níveis de etileno provavelmente ocorrer de forma rápida e transitória, considerando os picos na expressão imediatamente após 2h das pulverizações, mas o tempo de duração parece não exceder 24 horas. Este trabalho também evidencia que, provavelmente, ocorreu aumento na produção de etileno nas folhas após os tratamentos com 1-MCP+BTH e BTH, e que a expressão do gene *CaETR4-like* não impediu os órgãos florais de desencadear respostas a este hormônio. Portanto, estas podem ser algumas formas de ação que permite ao etileno funcionar como indutor da antese dos botões florais do café.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. **Proc Natl Acad Sci USA** 104:6484–6489, 2007.

ADAMS, D. O.; YANG, S. F. Ethylene biosynthesis: identification of laminocyclopropane- 1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. **Protocols of the National Academy of Science USA**, v. 76, p. 170–74, Jan. 1979.

AGROW. **Agra-net**. 2014. Disponível em: <<https://agra-net.net/agrow/>>. Acesso em: 08 fev. 2016.

ALBACETE, A. A.; MARTÍNEZ-ANDÚJAR, C.; PÉREZ-ALFOCEA, F. Hormonal and metabolic regulation of source–sink relations under salinity and drought: From plant survival to crop yield stability. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 1, p. 12-30, 2014.

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

ALONSO, J. M.; ECKER, J. R. The ethylene pathway: a paradigm for plant hormone signaling and interaction. **Science STKE**, v. 70, RE1. 2001.

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

ALVES, J. D. et al. Estudo da maturação do café por estímulo mecânico. In: **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, 1., 2003. Porto Seguro. Anais... Porto Seguro: EMBRAPA Café, CD-ROM., 2003.

ALVIM, P. Moisture stress as a requirement for flowering of coffee. **Science**, v. 132, n. 3423, p. 354-354, 1960.

ALVIM, P. T. **Factors affecting flowering of coffee**. In: Genes Enzymes and Population. New York: Plenum, SBR, A M. p.193-202, 1973.

ANDRADE, M. A. F. Relações hídricas e crescimento de plantas jovens de café sob diferentes regimes hídricos e dose de N e K. **Dissertação (Mestrado)**, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 55f., 2011.

ANGELOCCI, L. R. **Água na planta e trocas gasosas/energéticas com a atmosfera: introdução ao tratamento biofísico**. Piracicaba: Edição do autor, 272 p., 2002.

BARROS, R.S.; MAESTRI, M.; COONS, M. P. The physiology of flowering in coffee: a review. **J. Coffee Res.** 8:29-73, 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.

BAYLES, A. **Market scope understanding adjuvants**. 2014. Disponível em: <http://www.crop-protection-monthly.co.uk/>. Acesso em: 08. Fev. 2016.

BERGONCI, J. I.; PEREIRA, P. G. Comportamento do potencial da água na folha e da condutância estomática do milho em função da fração de água disponível no solo. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, 10 (2): 229 – 235, 2002.

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

BERNIER, G.; KINET, J. M.; SACHS, R. M. **The physiology of flowering**. Boca Raton: CRC, v.1-3, 1981.

BLANKENSHIP, S. Ethylene effects and the benefits of 1-mcp. **Perishables Handling Quarterly**, n.108, 2001.

BLANKENSHIP, S. M.; DOLE, J. M. 1-Methylcyclopropene: a review. **Postharv. Biol. Technol.** 28:1-25, 2003.

BOMFIM, H. et al. Efeito do déficit hídrico na floração do cafeeiro, cultivado no Oeste da Bahia, monitorado por meio do botão floral e do status hídrico da planta. **In: Simpósio dos Cafés do Brasil**. Anais... Águas de Lindóia – SP. Brasília: Embrapa Café, 2007.

BOUQUIN, T. et al. Wound and ethylene induction of the ACC oxidase melon gene CM-ACO1 occurs via two direct and independent transduction pathways. **Plant Mol. Biol.** 35, p.1029-1035, 1997.

BRIDSON, J. Nomenclatural notes on *Psilanthus*, including *Coffea* sect. *Paracoffea* (Rubiaceae tribe Coffeae). **Kew Bulletin**, v. 42, n. 2, p. 453-460, 1987.

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.

BROWN, B. I.; WONG, L. S. Postharvest changes in respiration, ethylene production, firmness and ripe fruit of sapodilla [*Manilkara zapota* (L.) Van Royen] different maturities. **Singapore Journal of Primary Industries**, Singapore, v. 15, n. 2, p. 109-121, 1987.

BUDZINSKI, I. G. F. et al. Análise de genes expressos durante estádios finais de maturação de frutos de café. In: **Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, 4., 2995, Londrina. Anais... Londrina: EMBRAPA Café, 1 CD-ROM, 2005.

BULENS, I. et al. Influence of harvest time and 1-MCP application on postharvest ripening and ethylene biosynthesis of 'Jonagold' apple. **Postharvest Biology and Technology**, v. 72, p. 11-19, 2012.

BURNS, J. K. 1-Methylcyclopropene Applications in Preharvest Systems: Focus on Citrus. **Hortscience**, v.43 (1), p.112-114, 2008.

CAMARGO, A. P. Florescimento e frutificação do café arábica nas diferentes regiões cafeeiras do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 20, n.7, p. 831-839, Mar. 1985.

CAMARGO, A. P. de; PEREIRA, A. R. **Agrometeorology of the coffee crop**. Geneva: World Meteorological Organization, 43 p., (CAgM Report, n. 58, WMO\TD n. 65), 1994.

CAMARGO, A. P.; CAMARGO, M. B. P. Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. **Bragantia**, Campinas, v. 60, n. 1, p. 65-68, jan. 2001.

CANNELL, M. G. R. Physiology of the coffee crop. **In: MN Clifford and KC Willson.** Coffee Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage, p. 108-134, New York: Croom Helm, 1985.

CAO, D. et al. Gibberellin mobilizes distinct DELLA-dependent transcriptomes to regulate seed germination and floral development in *Arabidopsis*. **Plant Physiol** 142: 509–525, 2006.

CARVALHO, A.; MÔNACO, L. C. Natural crosspollination in *C. arábica*. In: Internacional Horticultural Congress, 16., 1964, Brussels. **Proceedings...** Brussels, v4. P. 447-449, 1964.

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

CARVALHO, V. D.; CHALFOUN, S. M. **Colheita e preparo de café.** Lavras: UFLA/FAEPE, 36 p., 2000.

CASTRO, P. R. C. et al. Efeitos de ethephon e uréia na maturação de frutos e abscisão foliar do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.** Piracicaba: ESALQ, v.38, cap.1, p. 281-288, 1981.

CAVASINI, R. **Inibidores de etileno na pós-colheita de *Lisianthus*.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas – Botucatu. 93 f., 2013.

CHALFOUN, S. M.; REIS, P. R. A história da cafeicultura no Brasil. In: REIS, P. R.; CUNHA, R. L. (Ed). **Café Arábica do plantio á colheita.** Lavras: U.R. EPAMIG SM, 896 p., 2010.

CHANG, C. et al. *Arabidopsis* ethylene-response gene ETR1: Similarity of product to two-component regulators. **Science**, 262, 539–544, 1993.

CHANG, C; STADLER, R. Ethylene hormone receptor action in *Arabidopsis*. **Bioessays**, v. 23, p. 619-627, 2001.

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

CHEN, Y. F. et al. Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 19861-19866, 2002.

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.

COMPENDIUM. **Glossary of terms**. 2013a. Disponível em: [http://www.herbicide-adjuvants.com/glossary\\_of\\_tems.htm](http://www.herbicide-adjuvants.com/glossary_of_tems.htm). Acesso em: 08 fev. 2016.

COMPENDIUM. **Compendium of herbicide adjuvantes: organosilicone surfactante**. 2013b. Disponível em: <http://www.herbicide-adjuvants.com/adjprod-type.htm>. Acesso em: 08 fev. 2016.

CONSELHO DOS EXPORTADORES DE CAFÉ DO BRASIL (**CeCafé**). Relatório mensal: Novembro\2015. Disponível em: <http://www.cecafe.com.br/Menu/dados/exportacoes/CECAFE%20-%20Resumo%20das%20Exportacoes%20de%20Cafe%20NOVEMBRO%202015.pdf> >. Acesso em jan. 2016.

CONSELHO NACIONAL DE ABASTECIMENTO (**CONAB**). Acompanhamento da Safra Brasileira - Café (Safra 2013), Terceiro Levantamento, setembro de 2013. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_09\\_09\\_15\\_34\\_48\\_bol\\_etim\\_cafe\\_-\\_setembro\\_2013.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_09_09_15_34_48_bol_etim_cafe_-_setembro_2013.pdf) > Acesso em: nov. 2015

CONSELHO NACIONAL DE ABASTECIMENTO (**CONAB**). Acompanhamento da Safra Brasileira - Café (Safra 2014\15), Quarto Levantamento, dezembro de 2015. Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15\\_12\\_17\\_09\\_02\\_47\\_bol\\_etim\\_cafe\\_dezembro\\_2015\\_2.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_12_17_09_02_47_bol_etim_cafe_dezembro_2015_2.pdf) > Acesso em: jan. 2016.

CORNIC, G. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture: not by affecting ATP synthesis. **Trends in Plant Science**. v.5 , p.187-188. 2000.

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

- COSTE, R. **Les caféiers et lés café dans lè monde**. Paris: Larose, 365 p., 1955.
- CRISOSTO, C. H.; GRANTZ, D. A.; MEINZER, F. C. Effect of water deficit on flower opening in coffee (*Coffea arabica* L.). **Tree Physiol.** 10:127-139, 1992.
- CZARNY, J. C.; GRICHKO, V. P.; GLICK, B. R. Genetic modulation of ethylene biosynthesis and signaling in plants. **Biotechnology Advances**, p. 410–419, 2006.
- DaMATTA, F. M. et al. Photosynthesis in coffee (*Coffea arabica* and *C. canephora*) as affected by winter and summer conditions. **Plant Science**, 128 (1): 43 – 50, 1997.
- DaMATTA, F. M.; RAMALHO, J. D. C. **Impactos da seca e estresse de temperatura sobre a fisiologia cofee e produção: uma revisão.** Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, v.18, p. 55-81, 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.
- DAVIES, P. J. **Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!**. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 750 p., 2004.
- 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, 2006.
- 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.
- DE PAEPE, A.; VAN DER STRAETEN, D. Ethylene biosynthesis and signaling: an overview. **Vitamins; Hormones**, v. 72, p. 399–430, 2005.
- DESIKAN, R. et al. Ethylene-induced stomatal closure in *Arabidopsis* occurs via AtrbohF-mediated hydrogen peroxide synthesis. **The Plant Journal**, v. 47, n. 6, p. 907-916, 2006.
- DIAS, R. E. B. A. **Influência do uso de inibidor da biossíntese de etileno sobre a eficiência da colheita mecanizada do café.** Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 61 p., 2013.



DODD, I. C. et al. phenotypic reversion of ABA-deficient flacca tomato (*Solanum lycopersicum*) scions by a wild-type rootstock: normalizing shoot ethylene relations promotes leaf area but does not diminish whole plant transpiration rate. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 4029–4039, 2009.

ELLA, L. et al. . Effect of the ethylene action inhibitor 1-methylcyclopropene on parsley leaf senescence and ethylene biosynthesis. **Postharvest Biology and Technology**, v. 30, n. 1, p. 67-74, 2003.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (**EMBRAPA**). Tecnologia para produção de mudas clonais de café Robusta. Porto Velho, 2001. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/100722/1/folder-mudasclonais-cafe-robusta.pdf>>. Acesso em janeiro de 2016.

EVONIK. **Break Thru**. 2013. Disponível em: <<http://www.Break Thru.com>>. Acesso em: 08 fev. 2016.

EVONIK. Brochure Break Thru S240. 2014. Disponível em: <<http://www.Break Thru.com/product/Break Thru/Documents/brochure-Break Thru-s-240-PT-web.pdf>> . Acesso em: 08 fev. 2016.

FAGAN, E. B. et al. **Fisiologia Vegetal: Reguladores Vegetais**. Organização Andrei Editora, 300p., 2015.

FANTE, C. A. et al. O. 1-MCP nos aspectos fisiológicos e na qualidade pós-colheita de maçãs Eva durante o armazenamento refrigerado. **Cienc. Rural**, v.43, n.12 Santa Maria, 2013.

FELIPE, G. M. Etileno. **In: Fisiologia Vegetal 2**. 2. Ed. São Paulo: EPU, p. 163-192, 1986.

FREE, J. B. Insect pollination of crops. **Academic Press**, London, 1993.

FREITAS, M. N. **Métodos fisiológicos, bioquímicos e análise de imagens para avaliar a qualidade do café**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 165 p., 2013.

FRELLO, S; STUMMANN, B. M.; SEREK, M. Shoot regeneration of *Campanula carpatica* Jacq. (Campanulaceae) via callus phase. **Sci Hortic**, p. 85–90, 2002.

FUJIMOTO, S. Y. et al. *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression, **Plant Cell**, v. 12, p. 393–404, 2000.

FUKAZAWA, J. et al. DELLAs function as Coactivators of GAI-ASSOCIATED FACTOR1 in regulation of Gibberellin homeostasis and signaling in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, 26(7): 2920-29-38, 2014.

GAO, Z. et al. Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes. **J Biol Chem**, p. 34725-32, 2003.

GARDIN, J. P. P. **Desenvolvimento reprodutivo do cafeeiro: anatomia de vasos do xilema e dinâmica de carboidratos**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 105 p., 2006.

GASPARI-PEZZOPANE, C. et al. Caracterização de genes expressos durante o crescimento e maturação de frutos de café. **In: Simpósio de Pesquisa dos cafés do Brasil**. Anais... Águas de Lindóia, SP. Brasília:Embrapa Café, 2007.

GOMES-CADENAS, A. et al. Leaf abscission induced by ethylene in waterstressed intact seedlings of Cleopatra mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. **Plant Physiology**, v. 112, 1996.

GOUVEIA, N. M.; SONDAHL, M. Florescimento e maturação em *Coffea arabica* cv. catuaí vermelho. In: **Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras**, 9., São Lourenço. Anais... São Lourenço: CBPC, 1 CD-ROM, 1981.

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

GUERRA, A. F.; ROCHA, O. C.; RODRIGUES, G. C.; SANZONOWICZ, C.; FILHO, G. C. R.; TOLEDO, P. M. R.; RIBEIRO, L. F. Sistema de produção de cafeeiro irrigado: um novo enfoque. ABID. **Revista ITEM, Irrigação & Tecnologia Moderna**, n.73 Brasília/DF, p.52-61, 2007.

GUERREIRO-FILHO, O. et al. Origem e Classificação Botânica do Cafeeiro. In: CARVALHO, C. H. S. (Ed.). **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília: Embrapa Café, 334p, 2008.

GUO, H. W.; ECKER, J. R. The ethylene signaling pathway: new insights. **Curr Opin Planta Biol**, p. 40-49, 2004.

HALL, A. E. et al. Ethylene perception by the ERS1 Protein in *Arabidopsis*. **Plant Physiol**. 123, p.1449-1457, 2000.

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.

HILL, R. M. **Contribution from David Stock of Syngenta, Jealott's Hill, UK and Executive Committee Member of the ISAA**. Agrow, London: Informa UK Ltd., p.114-115, 2006.

HOEBERICHTS, F. A.; VAN DER PLAS, L. H. W.; WOLTERING, E. J. Percepção de etileno é necessário para a expressão dos genes relacionada com o amadurecimento do tomate e fisiológica associada alterações, mesmo em estádios avançados do amadurecimento. **Postharvest Biol Technol**, p. 125-133, 2002.

HUA, J. et al. Ethylene insensitivity conferred by Arabidopsis ERS gene. **Science**, 269, 1712–1714, 1995.

HUA, J.; MEYEROWITZ, E. M. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in Arabidopsis thaliana. **Cell** 94, 261–271, 1998.

JIANG, Y. et al. Softening response of banana fruit treated with 1-methylcyclopropene to high temperature exposure. **Plant Growth Regul.**,p. 7–11, 2002.

JOHNSON, J. W. **Studies of the carbon (7) hydrogen (6) and 1,3-pentadiyne energy surfaces (cycloheptatetraene, diazocyclopentadiene)**. PhD Thesis Univ. of Calif. Los Angeles, 1987.

JOHNSON, P. R.; ECKER, J. R. The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective. **Annu. Rev. Genet.** 32, 227–254, 1998.

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.

JONES, M. L.; WOODSON, W. R. Pollination-induced ethylene in carnation (role of stylar ethylene in corolla senescence). **Plant Physiology**, v. 115, n. 1, p. 205-212, 1997.

KADER, A. A. **Postharvest technology of horticultural crops**. Oakland: Divisão of Agricultural and Natural Resources, 2ed. California: university of California, 296p., 1992.

KAWAKAMI, E. M. et al. Effect of 1-MCP on the Growth and Yield of Cotton. **Summaries of Arkansas Cotton Research**, p. 58-61, 2006.

KENDE, H. Ethylene biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 44, n. p. 283-307, 1993.

KENDRICK, M. D.; CHANG, C. Ethylene signaling: new levels of complexity and regulation. **Curr Opin Plant Biol.**,11(5):479-85, 2008.

KEVANY, B. et al. Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. **Plant Journal**, v. 51, n. 481, p. 458-467, 2007.

KIEBER, J. J. et al. CTR1, A negative regulator of the ethylene response pathway in arabidopsis, encodes a member of the raf family of proteinkinases. **Cell**, v. 72, n. 3, p. 427-441, 1993.

KLEIN, A. M.; STEFFAN-DEWENTER, I.; TSCHARNTKE, T. Bee Pollination and fruit set of *Coffea arabica* and *C. canephora* (Rubiaceae). **American Journal of Botany**, v. 90, n. 1, p. 153-157, 2003.

KOHLI, A. et al. The phytohormone crosstalk paradigm takes center stage in understanding how plants respond to abiotic stresses. **Plant Cell Reports**, v. 32, n. 7, p. 945-957, 2013.

KRAJEWSKI, A. J.; RABE, E. Citrus flowering: A critical evaluation. **Journal of Horticultural Science**, v.70, n.3, p.357-374, 1995.

KUDOYAROVA, G. R. et al. Effect of partial rootzone drying on the concentration of zeatin-type cytokinins in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) xylem sap and leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 2, p. 161-168, 2007.

KUMAR, D. Some aspects of the physiology of *Coffea arabica* L. A review. **Kenia Coffee**, Nairobi, v.44, p.9-47, 1979.

LARRAINZAR, E. et al. Drought stress provokes the down-regulation of methionine and ethylene biosynthesis pathways in *Medicago truncatula* roots and nodules. **Plant, Cell & Environment**, v. 37, n. 9, p. 2051-2063, 2014.

LASHERMES, P.; ANDRADE, A. C.; ETIENNE, H. Genomics of coffee, one of the world's largest traded commodities. In: Moore H, Ming R (Ed.). Genomics of tropical crop plants. Berlin: **Springer**, p. 203–226, 2008.

LASHERMES, P. et al. Molecular characterization and origin of the *Coffea Arabica* L. genome. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 261, n2, p. 250-266, 1999.

LIMA, A. A. **Caracterização *in silico* e análise da expressão de prováveis genes das rotas de biossíntese e sinalização do etileno em frutos de diferentes cultivares de café (*Coffea arabica*)**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 125p., 2011.

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, 151p., 2015.

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

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.

LUO, J. et al. A DELLA gene, *RhGAI1*, is a direct target of EIN3 and mediates ethylene-regulated rose petal cell expansion via repressing the expression of *RhCesA2*. **Journal of Experimental Botany** 64, 5075-5084, 2013.

MADHAVAN, S.; CHROMINISKI, A.; SMITH, B. N. Effect of ethylene on stomatal opening in tomato and carnation leaves. **Plant and Cell Physiology**, v. 24, n. 3, p. 569-572, 1983.

MAGALHÃES, 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. 419-421, 1976.

MAHOUACHI, J. et al. Antagonistic changes between abscisic acid and gibberellins in citrus fruits subjected to a series of different water conditions. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 24, n. 3, p. 179-187, 2005.

MAJEROWICZ, N.; SÖNDAHL, M. R. Induction and differentiation of reproductive buds in *Coffea arabica* L. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 2, p. 247-254, 2005.

MARRACCINI, P. et al. **Differentially expressed genes and proteins upon drought acclimation in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora***. *J Exp Bot.*; 63(11): 4191–4212, 2012.

MASSON, G. L. et al. Restrição hídrica no crescimento de plantas jovens de *Crotalaria juncea* L. (Fabaceae) em casa de vegetação. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n.21; p 1693-1701, 2015.

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

MAZZAFERA, P.; CARVALHO, A. Produção e tolerância à seca de cafeeiros. **Bragantia**, 46 (2): 403 – 415, 1987.

MELO, B; SOUSA, L. B. biologia da reprodução de *Coffea arábica*. L. e *Coffea canephora* Pierre. **Revista Verde (Mossoró – RN – Brasil)** v.6, n.2, p. 01-07, 2011.

MENG, Y. et al. **Precise spatio-temporal modulation of ACC synthase by MPK6 cascade mediates the response of rose flowers to rehydration**. *Plant J.*, p. 941-50, 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.

MIYAZAKI, J. H.; YANG, S. F. The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis. **Physiologia Plantarum**, v. 69, n. 2, p. 366-370, 1987

MORAIS, H. et al. Escala fenológica detalhada da fase reprodutiva de *Coffea arabica*. **Bragantia** 67(1): 257:260, 2008.

NAKATSUKA, A. et al. Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. **Plant Physiology**, v. 118, n. 4, p. 1295-1305, 1998.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: Propiedades e aplicacoes. **Quim. Nova**, 25(5):772-776, 2002.

NOGUEIRA, A. C. L. **Agricultura: as Exportações Brasileiras de Café. Análise de conjuntura**, 2014.

NOGUEIRA, A. M. et al. Avaliação da maturação dos frutos de linhagens das cultivares Catuaí Amarelo e Catuaí Vermelho (*Coffea arabica* L.) plantadas individualmente e em combinações. **Cienc. Agrotec.**, Lavras, v.29, n.1, p. 18-26, 2005.

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

ORBOVIC, V.; JIFON, J. L.; SYVERTSEN, J. P. Foliar-applied surfactants and urea temporarily reduce carbon assimilation of grapefruit leaves. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 126, n. 4, p. 486-490, 2001.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO CAFÉ (OIC). Disponível em: <[http://consorciopesquisacafe.com.br/arquivos/consorcio/publicacoes\\_tecnicas/Relatorio\\_sobre\\_o\\_mercado\\_de\\_cafe\\_Novembro\\_2015.pdf](http://consorciopesquisacafe.com.br/arquivos/consorcio/publicacoes_tecnicas/Relatorio_sobre_o_mercado_de_cafe_Novembro_2015.pdf)>. Acesso em: jan. 2016.

PEREIRA, A. A. et al. In: REIS, P. R. **Café Arábica do plantio á colheita**. Lavras: U. R. EPAMIG SM, 1v., 896 p., 2010.

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

PEREIRA, L. F. P. et al. Ethylene production and acc oxidase gene expression during fruit ripening of *Coffea arabica* L. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 3, p. 283-289, 2005.

PEREIRA, M. R. R. **Potenciais hídricos no solo sobre a eficácia de herbicidas em plantas daninhas monocotiledôneas.** Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu, 175 f., 2010.

PEREIRA, W. S. P.; BELTRAN, A. Mecanismo de ação e uso do 1-MCP – bloqueador de etileno, visando prolongar a vida útil das frutas. In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Manejo integrado: fruteiras tropicais - doenças e pragas.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 31-44, 2002.

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

POSÉ, D.; YANT, L.; SCHMID, M. The end of innocence: flowering networks explode in complexity. **Curr Opin Plant Biol**, 15(1):45-50, 2012.

RAMÍREZ, B. et al. **Variabilidad climática y la floración del café en Colombia.** Gerencia Técnica / Programa de Investigación Científica, Fondo Nacional del Café, 2001.

RAMSEY, R. J. L.; STEPHENSON, G. R.; HALL, J. C. A review of the effects of humidity, humectants, and surfactant composition on the absorption and efficacy of highly water-soluble herbicides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 82, p. 162–175, 2005.

REDDY, A. G. S. M. Quiescence of coffee flower buds and observations on the influence of temperature and humidity on its release. **Journal of Coffee Research**, 9 (1): 1-13, 1979.

REID, M. S. et al. Ethylene and silver thiosulfate influence opening of cut rose flowers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 1989.

RENA, A. B. et al. **Coffee.** In: Schaffer, B., Andersen, P.C. (eds.). Handbook of environmental physiology of tropical fruit crops: sub-tropical and tropical crops. 1. Ed. Boca Raton: CRC Press, p. 101-122, 1994.

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 Fosfato, p.13-106, 1985.

RENA, A. B.; BARROS, R. S. Aspectos críticos no estudo da floração do café. In: Zambolim L (Ed.). **Efeitos da Irrigação Sobre a Qualidade e Produtividade do Café**, Universidade Federal de Viçosa, p.149-172., 2004.



RODRIGUES, W. P. **Aspectos fisiológicos e produtividade de *Coffea sp.* na região noroeste do estado do Rio de Janeiro.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, 120p., 2013.

RODRIGUEZ, F. I. et al. A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. **Science**, p. 996–998, 1999.

SÁGIO, S. A. **Análise molecular e fisiológica do etileno durante o amadurecimento de frutos de café.** Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 116p., 2012.

SÁGIO, S. A. et al. Identification and expression analysis of ethylene biosynthesis and signaling genes provides insights into the early and late coffee cultivars ripening pathway. **Planta**, 2014.

SÁGIO, S. A. et al. Physiological and molecular analyses of early and late *Coffea arabica* cultivars at different stages of fruit ripening. **Acta Physiol Plant**, 35:3091-3098, 2013.

SAKIYAMA, N. S.; PEREIRA, A. A.; ZAMBOLIM, L. **Melhoramento de café arábica.** In: BORÉM, A. (Ed.). Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: UFV, p. 189-204, 1999.

SALVA, T. J. G. et al. **Contribuições atuais para a melhoria da qualidade do café arábica.** Documentos, IAC, Campinas, 91, 2009.

SALTVEIT, M. E. Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 15 (3), 1999.

SANTOS, R. S. **Regulação transcricional e epigenética de ERFs em arroz sob estresse abiótico.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Pelotas. 98f., 2012.

SANTOS, T. B. et al. Caracterização nutricional de acessos provenientes da Etiópia de Café Arábica. **Coffee Science**, Lavras, v. 10, n. 1, p. 10 - 19, 2015.

SAKAI, H. et al. ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 95, 5812–5817, 1998.

SCARIOT, V. et al. Ethylene control in cut flowers: Classical and innovative approaches. **Postharvest Biology and Technology**, v. 97, p. 83-92, 2014.

SCHALLER, G. E.; BLEECKER, A. B. Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the Arabidopsis ETR1 gene. **Science** 270, 1809–1811, 1995.

SCHRODER, R. et al. Reduction of ethylene emission from Scots pine elicited by insect egg secretion. **Journal of Experimental Botany**, 58: 1835-1842, 2007.

SCHUCH, U. K.; FUCHIGAMI, L. H.; NAGAO, M. A. Flowering, ethylene production, and ion leakage of coffee in response to water stress and gibberellic acid. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 117, n. 1, p. 158-163, 1992.

SCHUCH, U. K.; FUCHIGAMI, L. H.; NAGAO, M. A. Gibberellic acid causes earlier flowering and synchronizes fruit ripening of coffee. **J. Plant Growth Regulat.** 9:59-64, 1990.

SEREK, M.; ANDERSEN, A. S. AOA and BA influence on floral development and longevity of potted ‘Victory Parade’ miniature rose. **HortScience**, p. 1039–1040, 1993.

SEREK, M.; REID, M. S. Anti-ethylene treatments for potted Christmas cactus — efficacy of inhibitors of ethylene action and biosynthesis. **HortScience**, p. 1180–1181, 1993.

SEREK, M. et al. Controlling ethylene responses in flowers at the receptor level. **Biotechnology Advances**, 368–381, 2006.

SIEVERDING, E. et al. Break Thru S240 – A new adjuvante class for the application of crop protection products in Italy. **ATTI Giornale Fitopatologiche**, v. 1, p. 15-22, 2006.

SILVA, E. A. et al. Influência de déficits hídricos controlados na uniformização do florescimento e produção do cafeeiro em três diferentes condições edafoclimáticas do estado de São Paulo. **Bragantia**, 68 (2): 493 – 501, 2009.

SILVEIRA, J. A. G. et al. Roots and leaves display contrasting osmotic adjustment mechanisms in response to NaCl-salinity in *Atriplex nummularia*. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 66, n. 1, p. 1-8, 2009.

SISLER, E. C. The discovery and development of compounds counteracting ethylene at the receptor level. **Biotechnol. Adv.** 24:357– 367, 2006.

SISLER, E. C., BLANKENSHIP, S. M., MAY. **Methods of counteracting an ethylene response in plants**. U.S. Patent Number 5,518,988, 1996.

SISLER, E. C., SEREK, M. Compounds controlling the ethylene receptor. **Bot. Bull. Acad. Sin.** 40, 1-7, 1999.

SISLER, E. C., SEREK, M. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: recent developments. **Physiol. Plant.** 100, 577-582, 1997.

SKOG, L. J.; SCHAEFER, B. H.; SMITH, P. G. 1-Methylcyclopropene preserves the firmness of plums during postharvest storage and ripening. **Acta Hort.**, p. 171–172, 2001.

SOLANO, R. et al. Nuclear events in ethylene signaling: A transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. **Genes Dev.** 12, 3703–3714, 1998.

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**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 117-125, 2005.

SOARES, A. R. et al. Estudo do efeito do déficit hídrico sobre a quebra da dormência na floração de um cultivar de café arábica irrigado por gotejamento. **In: simpósio de Pesquisas dos Cafés do Brasil**, 2., 2001, Vitória. Resumos – Brasília: Embrapa Café, p.48-49, 2001.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia para a identificação das famílias de angiospermas da flora, baseada em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 640p., 2005.

SPANUDAKIS, E.; JACKSON, S. The role of microRNAs in the control of flowering time. **Journal of Experimental Botany**, 65 (2): 365-380, 2014.

SPRANKLE, P.; MEGGIT, W. F.; PENNER, D. Absorption, action, and translocation of glyphosate. **Weed Sci.** 23:235-240, 1975.

SRIKANTH, A.; SCHMID, M. Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. **Cell. Mol. Life Sci.** 68, 2013–2037, 2011.

SRISKANDARAJAH, S.; FRELLO, S.; SEREK, M. Induction of adventitious shoots in vitro in *Campanula carpatica*. **Plant Cell Tissue Organ**, p. 295–298, 2001.

STEPANOVA, A. N.; ALONSO, J. M. Ethylene signaling and response pathway: a unique signaling cascade with a multitude of inputs and outputs. **Physiol Plant**, p. 195–206, 2005.

TANG, X. et al. Auto-regulation of the promoter activities of Arabidopsis 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes *AtACS4*, *AtACS5*, and *AtACS7* in response to different plant hormones. **Plant Science**, v. 175, p. 161–167, 2008.

TANG, X.; WOODSON, W. R. Temporal and spatial expression of laminocyclopropane-1-carboxylate oxidase mRNA following pollination of immature and mature petunia flowers. *Plant Physiology*, v. 112, n. 2, p. 503511, 1996.

TENHUNEN, J. D.; PEARCY, R. W.; LARANCE, O. L. **Diurnal variation in leaf conductance and gas exchange in natural environments**. In: Zeiger, E., Farquhar, G.; Cowan, I. (eds.). *Stomatal function*. Stanford: Stanford University Press, p. 323-351, 1987.

THEOLOGIS, A. Ethylene signalling: Redundant receptors all have their say. **Current Biology**, 8:R875–R878, 1998.

THOMAZIELLO, R. A. et al. **Café Arábica: cultura e técnicas de produção**. Campinas: IAC (Boletim Técnico, 187), 82p., 2000.

TIEMAN, D. E. et al. The tomato ethylene receptors NR and LeETR4 are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family. **Proc Natl Acad Sci USA**, p. 5663–5668, 2000.

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.

VAN STADEN, J. The effect of emasculation on the endogenous cytokinin levels of *Cymbidium* flowers. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.10, n.3, p. 277-284, 1979.

VERA-NÚÑEZ, J. A. et al. Efecto de los surfactantes sobre la absorción de agroquímicos en plantas. **Nova Scientia**, 2010.

VILAS BOAS, E. V. B. 1- MCP: um inibidor da ação do etileno. In: **Simpósio de controle de doenças de plantas: patologia pós-colheita de frutos e hortaliças**, 3. Lavras-MG. **Palestras...**2002.

VILELA, F. K. J. **Temperatura e disponibilidade hídrica e seus efeitos na fotossíntese e no crescimento de laranjeiras Valência enxertadas em limoeiro Cravo ou citrumeleiro Swingle**. Dissertação (Mestrado), Instituto Agrônômico de Campinas, 50fls, 2012.

WANG, K.; LI, H.; ECKER, J. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **Plant Cell**, 14:S131-S151, 2002.

WANG, N. N.; SHIH, M. C.; LI, N. The GUS reporter-aided analysis of the promoter activities of Arabidopsis ACC synthase genes *AtACS4*, *AtACS5*, and *AtACS7* induced by hormones and stresses. **J Exp Bot**, p. 909-920, 2005.

WATKINS, C. B. **Ethylene synthesis, mode of action, consequences and control. Fruit quality and its biological basis**, p. 180–224, 2002.

WATKINS, C. B. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 4, p. 389-409, 2006.

WATKINS, C. B. Postharvest ripening regulation and innovation in storage technology. **Acta Hort.** 796:51-58, 2008.

WILKINSON, S.; DAVIES, W. J. ABA based chemical signalling: the co- ordination of responses to stress in plants. **Plant, Cell &Environment**, v. 25, n. 2, p. 195-210, 2002.

WILKINSON, J. Q. et al. A dominant mutant receptor from Arabidopsis confers ethylene insensitivity in heterologous plants. **Nature Biotechnology**, p. 444 – 447, 1997.

WOESTE, K. E.; KIEBER, J. J. A strong loss-of-function mutation in RAN1 results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype. **Plant Cell**, p. 443-455, 2000.

WOLTERING, E. J.; HARKEMA, H. Effect of exposure time and temperature on response of carnation cut flowers to ethylene. **Acta Hortic**, p. 255–266, 1987.

XU, L. et al. Droplet evaporation and spread on waxy and hairy leaves associated with type and concentration of adjuvants. **Pest Management Science**, v. 67, n. 7, p. 842-851, 2011.

XUE, J. et al. Expression of ethylene biosynthetic and receptor genes in rose floral tissues during ethylene-enhanced flower opening. **J Exp Bot.**, p. 2161–2169, 2008.

YAMASAKI, S.; DILLENBURG, L. R. Measurements of leaf relative water content in *Araucaria angustifolia*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 2, p. 69-75, 1999.

YANG, X. et al. Effect of ethylene and 1-MCP on expression of genes involved in ethylene biosynthesis and perception during ripening of apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 78, p. 55-66, 2013.

YANG, S. F.; HOFFMAN, N. E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annu. Ver. Plant. Physiol.**, vol. 35, p. 155-169, 1984.

YANG, W. et al. Severe water deficit-induced ethylene production decreases photosynthesis and photochemical efficiency in flag leaves of wheat. **Photosynthetica**, v. 52, n. 3, p. 341-350, 2014.

YU, S. et al. Gibberellin regulates the Arabidopsis floral transition through *miR156*-targeted *SQUAMOSA* promoter binding-like transcription factors. **Plant Cell**; 24(8): 3320-32, 2012.

ZHANG, C. et al. Global analysis of gene expression profiles in physic nut (*Jatropha curcas* L.) seedlings exposed to drought stress. **BMC Plant Biology**, 15:17, 2015.

ZIK, M.; IRISH, V. F. Flower development: initiation, differentiation, and diversification. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 19, n. 1, p. 119-140, 2003.

ZIMMER, P. D. **Caracterização parcial da ACC (ácido 1-carboxílico 1-aminociclopropano) oxidase em frutos climatéricos**. Dissertação (Mestrado) -

Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas,  
Pelotas, 41f., 1998.

## APÊNDICES – Dados Metereológicos

### APÊNDICE A

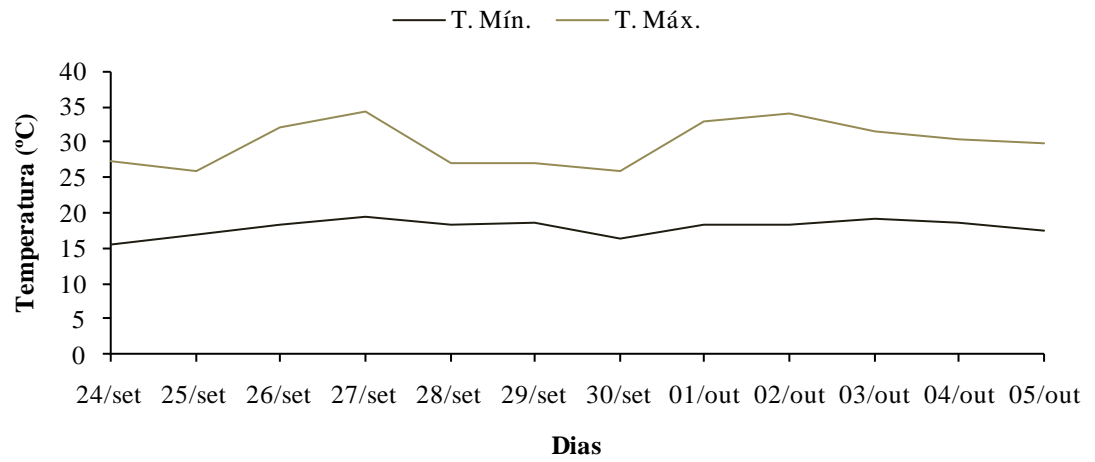


Gráfico 1: Médias diárias de temperatura durante a realização do experimento na Fazenda Cafuá: variação de uma mínima de 15,58°C para máxima de 34,25°C



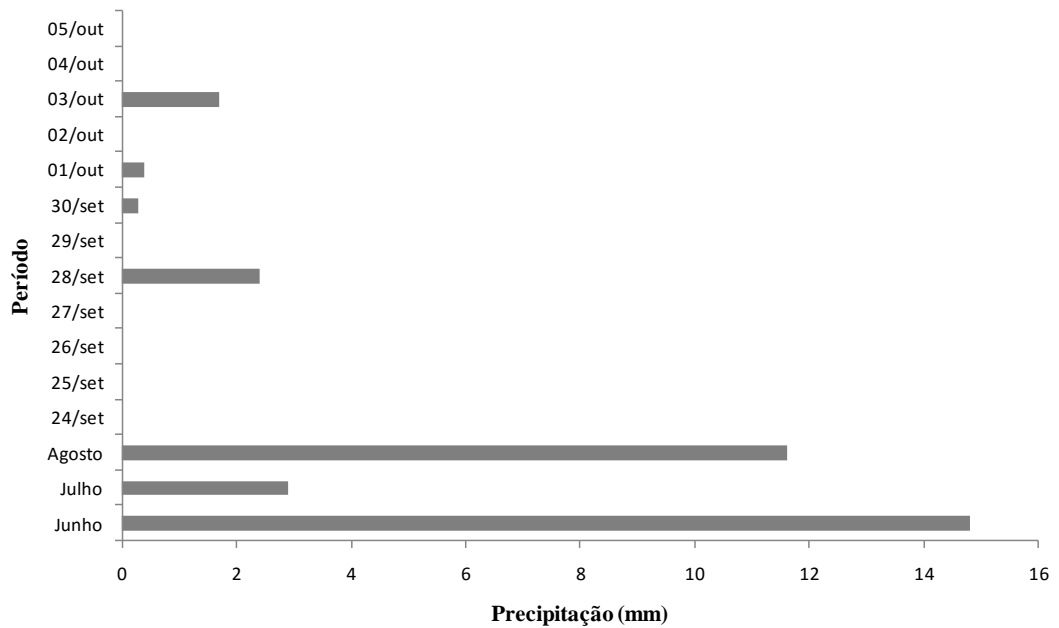
**APÊNDICE B**

Gráfico 2: Índices mensais de precipitação três meses antes da implantação do experimento e índices diários durante a realização do experimento na Fazenda Cafuá. Durante a realização do experimento a precipitação total foi de 4,8 mm.