



BRUNO DE OLIVEIRA GARCIA

**REGULAÇÃO DE miRNAs EM GEMAS DE *Coffea arabica*
COM APLICAÇÃO DE 1-MCP EM DIFERENTES
CONDIÇÕES HÍDRICAS**

LAVRAS-MG

2019

BRUNO DE OLIVEIRA GARCIA

Regulação de miRNAs em gemas de *Coffea arabica* com aplicação de 1-MCP em diferentes condições hídricas

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

Prof. Antonio Chalfun Júnior, PhD.
Orientador
Dr^a. Christiane Noronha Fernandes Brum
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2019**

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

Garcia, Bruno de Oliveira.

Regulação de miRNAs em gemas de *Coffea arabica* com aplicação de 1-mcp em diferentes condições hídricas / Bruno de Oliveira Garcia. - 2019.

58 p.

Orientador(a): Antonio Chalfun Junior.

Coorientador(a): Christiane Noronha Fernandes Brum.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. miRNAs. 2. 1-MCP. 3. Expressão gênica. I. Chalfun Junior, Antonio. II. Fernandes-Brum, Christiane Noronha. III. Título.

BRUNO DE OLIVEIRA GARCIA

**REGULAÇÃO DE miRNAs EM GEMAS DE *Coffea arabica* COM APLICAÇÃO
DE 1-MCP EM DIFERENTES CONDIÇÕES HÍDRICAS**

***MiRNAs REGULATION IN COFFEA ARABICA BUDS WITH 1-MCP
APPLICATION UNDER DIFFERENT WATER CONDITIONS***

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

Aprovado em 19 de Fevereiro de 2019
Antonio Chalfun Júnior, PhD. (UFLA)
Dr. Samuel Chaves Silva (UFMG)
Dr. Renato Ribeiro de Lima (UFLA)

Prof. Antonio Chalfun Júnior, PhD.
Orientador
Dr^a. Christiane Noronha Fernandes Brum
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2019**

*A Deus por me sustentar nas adversidades, aos meus pais Gilberto e Sebastiana, a
minha irmã Thaís, e aos meus amigos que se tornaram mais que apenas amigos, mas
também irmãos.
Dedico*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar à frente de tudo, sempre me protegendo e abençoando, para que eu conseguisse concluir mais essa etapa.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Programa de Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao professor Antonio Chalfun Júnior, pela oportunidade, orientação e disposição para ajudar a solucionar os problemas durante este percurso.

À Christiane Noronha Fernandes Brum pela coorientação, paciência, companheirismo e principalmente por sua amizade.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café (INCT Café) pelo apoio financeiro na construção das bibliotecas de *sRNA-seq*.

Aos meus pais Gilberto e Sebastiana a minha irmã Thaís, ao meu cunhado Felipe e meu sobrinho Arthur pelo apoio e amor que sempre demonstraram, e pelas palavras de incentivo nos momentos difíceis.

À Elisangela, Adeilson, Diogo, Eliza, Beatriz e Marcelo que são minha família do coração, que me deram todo suporte que precisei nesses dois anos de mestrado.

A todos os membros atuais e que já não fazem mais parte do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas (LFMP), por toda a paciência, ajuda e contribuição neste trabalho e todo conhecimento transferido nessa fase.

Aos meus colegas de trabalho, que se tornaram amigos e a melhor equipe, Iasminy, Kauanne, Gabriel e Rafael Moreira.

À Kauanne por toda a amizade, apoio e paciência durante os dias de trabalho e fora deles, sempre me incentivando com muito carinho e pulso firme.

À Ana Claudia pela amizade de mais de uma década, por todos os cafés, paciência e todo amor.

À Mariane por em tão pouco tempo se tornar uma amizade indispensável em minha vida.

À Elizanne, que além de dividir casa comigo sempre me apoiou e torceu por mim dividindo também alegrias e preocupações.

Ao meu Trio de mestres, Fernanda e Samira, que estão comigo desde o começo do mestrado, obrigado pela amizade e companheirismo.

Ao Danilo e Juliana que mesmo de longe estão sempre me apoiando com um carinho e amizade indescritíveis.

Aos meus amigos que não citei aqui, da graduação, os que fiz Lavras, carrego em meu coração.

A todos os funcionários do setor de Fisiologia Vegetal, que sempre contribuem para o nosso bem-estar durante o trabalho e estudos.

MUITO OBRIGADO!

*“Conhecimento é liberdade, amizade é Segurança.”
(Garcia)*

Resumo

O café é uma *commodity* de grande importância econômica mundial. A cadeia produtiva do café gera milhões de empregos em diversos seguimentos. Diversas cultivares já foram desenvolvidas visando a melhoria da produção, entretanto o florescimento assincrônico é um problema para a cultura. A assincronia ocasiona amadurecimento desuniforme dos frutos e, portanto, afeta a qualidade final do produto. Diferente da maioria das plantas, que emitem as inflorescências na primavera e frutificam no mesmo ano fenológico, o café arábica (*Coffea arabica* L.) é uma espécie bianual e leva dois anos para completar seu ciclo reprodutivo. O período de indução floral ocorre no primeiro ano fenológico com a formação e o desenvolvimento das gemas florais. Depois de terem completado seu desenvolvimento, essas gemas entram em dormência e ficam prontas para a antese, que acontece quando há um aumento substancial do potencial hídrico, fenômeno que pode ser induzido por episódios de chuva ou irrigação programada. Os microRNAs têm se destacado em estudos onde surgem como reguladores chave das vias de resposta a fitormônios em plantas, afetando o seu metabolismo, distribuição e percepção. A floração do cafeeiro não é controlada apenas por um fator isolado, esse processo é influenciado pela ação de diferentes fitohormônios e miRNAs, os quais interagem numa complexa rede de regulação. O etileno é um fitormônio envolvido em diversos processos morfofisiológicos, estando relacionado com respostas a estímulos de estresses abióticos, com relação ao florescimento, o etileno pode inibir ou induzir a antese em diferentes espécies, em cafeeiro o uso de um inibidor da ação do etileno o 1-metilciclopropeno (1-MCP) foi capaz de promover a antese em flores após um período de restrição hídrica. Os miRNAs estão envolvidos em diversas fases do desenvolvimento vegetal atuando como regulador da expressão gênica a nível pós transcricional, regulam a expressão de genes em diversas fases desenvolvimento vegetal, incluindo a antese, e são capazes de estabelecer uma comunicação com fitormônios. Com o intuito de investigar a participação de miRNAs no processo de florescimento do cafeeiro e a possível interação desses com a inibição da ação etileno, esse trabalho teve como objetivo principal avaliar o efeito da aplicação de 1-MCP sobre a expressão de miRNAs potencialmente responsivos em gemas de cafeeiro sob diferentes condições hídricas. Por fim, os miRNAs miR157, miR395 e miR396 e seus respectivos alvos, SPL2, SULTR2;1 e GsSRK, foram selecionados para a análise da expressão gênica por *stem-loop RT-PCR*. Os resultados dos experimentos de RT-qPCR mostraram que nas plantas sob estresse hídrico, apenas o miR157a-5p foi responsivo a aplicação de 1-MCP. Em plantas reirrigadas, miR395a-3p apresentou uma menor expressão em relação ao controle e o miR396a-3p foi mais expresso para esta condição. Com relação aos alvos, não foi observada expressão diferencial para qualquer um dos tratamentos. Para as plantas que não passaram por déficit hídrico não houve diferença de expressão para os três miRNAs. Os resultados demonstram que os miRNAs participam da quebra ou manutenção da dormência de gemas de cafeeiro em função da condição hídrica da planta ou com a aplicação de 1-MCP.

Palavras chave: miRNAs. 1-MCP. Fitormônios. Expressão gênica.

Abstract

Coffee is a commodity with great economic importance in the world. The coffee production chain generates millions of jobs in various segments. Several cultivars have already been developed aiming at the production's improvement, but the asynchronous flowering is a problem for the culture. Asynchrony causes uneven maturation of the fruits, which affects the final quality of the product. Unlike most plants that emit inflorescences during the spring and fructify within the same phenological year, Arabica coffee (*Coffea Arabica* L.) is a biannual species and takes two years to complete its reproductive cycle. The floral induction period occurs in the first phenological year with the formation and development of the floral buds. After completing their development, these buds fall into dormancy and become ready for anthesis, which occurs when there is a substantial increase in water potential, a phenomenon that can be induced by episodes of rain or scheduled irrigation. MicroRNAs (miRNAs) have been prominent in studies where they appear as key regulators of response to phytohormones pathways in plants, affecting their metabolism, distribution, and perception. The flowering of the coffee tree is not controlled by an isolated factor. This process is influenced by the action of different phytohormones and miRNAs, which interact in a complex regulation network. Ethylene is a phytohormone involved in several morphophysiological processes, being related to responses to abiotic stress. In relation to the flowering, the ethylene can inhibit or induce anthesis in different species. In coffee trees, the use of an ethylene action inhibitor, 1-methylcyclopropene (1-MCP) was able to promote the anthesis in flowers after a period of water restriction. miRNAs are involved in several phases of the plant development, acting as regulators of gene expression at the post-transcriptional level. The miRNAs act by regulating the gene expression in several stages of the plant development, including anthesis, and are able to establish a communication with phytohormones. In order to investigate the participation of miRNAs in the coffee flowering process, and the possible interaction of them with the inhibition of ethylene action, this study aimed to evaluate the effect of the application of 1-MCP on the expression of potentially responsive miRNAs in coffee buds under different water conditions. Therefore, miRNAs miR157, miR395, miR396, and their respective targets, SPL2, SULTR2;1 and GsSRK, were selected for analysis of gene expression by stem-loop RT-PCR. The results of the RT-qPCR experiments showed that in plants under water stress, only miR157a-5p was responsive to the application of 1-MCP. In the case of reirrigated plants miR395a-3p showed lower expression than the control, and miR396a-3p was more expressed for this same condition. Regarding the targets, no differential expression was observed for any of the treatments. For plants that did not undergo water deficit, there was no difference in the expression for the three miRNAs. The results demonstrate that the miRNAs participate in the breakage or maintenance of the coffee bud dormancy depending on the water availability or the 1-MCP application.

Key words: miRNAs. 1-MCP. Phytohormones. Gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fases fenológicas do cafeeiro Arábica nas condições climáticas do Brasil .	18
Figura 2 - Escala das fases de desen. floral de Coffea arabica com ênfase na fase G....	19
Figura 3 - Ligação do 1-MCP aos recep. de etileno assoc. às membranas celulares.	22
Figura 4 - Biogênese de miRNAs em plantas.....	24
Figura 5 - Transição da fase veget. para reprod. mediada por miR156 e miR172.....	26
Figura 6 - Amplificação de miRNAs por stem-loop-RT-PCR.....	34
Figura 7 - Gráfico de expressão gênica relativa para o microR157a-5p.....	39
Figura 8 - Gráfico de expressão gênica relativa para o miR395a-3p.....	41
Figura 9 - Gráfico de expressão gênica relativa para o miR396a-3p.....	42
Figura 10 - Gráfico de expressão gênica relativa para o SPL2.....	45
Figura 11 - Gráfico de expressão gênica relativa para o SULTR2;1.....	46
Figura 12 - Gráfico de expressão gênica relativa para o GsSRK.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das abreviações utilizadas nas amostras.....	31
Tabela 2 - – Seq. de primers e eficiência da amplificação por stem-loop RT-PCR.....	35
Tabela 3 – Sequência de primers e eficiência da amplificação por RT-PCR.....	37
Tabela 4 - miRNAs e Alvos, identificados utilizando o software psRNA Target.....	44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1. Caracterização da espécie de estudo	17
2.2. Florescimento; aspectos moleculares.....	19
2.3. Etileno, 1-MCP e o controle do florescimento do cafeeiro	21
2.4. miRNAs; biogênese e função biológica em plantas	22
2.5. miRNAs no desenvolvimento floral	25
2.6. Ação de fitormônios e miRNAs na regulação do desenvolvimento	28
3. HIPÓTESE.....	29
4. OBJETIVOS.....	29
4.1. Objetivos específicos	30
5. MATERIAL E MÉTODOS	30
5.1. Local, período experimental e material vegetal.....	30
5.2. Tratamentos e delineamento experimental	30
5.3. Coleta do material	31
5.4. Análise da expressão gênica	32
5.4.1. Extração de RNA e tratamento com DNase.....	32
5.4.2. Quantificação e análise da qualidade do RNA.....	32
5.4.3. Seleção dos miRNAs.....	33
5.4.4. Síntese de cDNA	33
5.4.5. Expressão dos miRNAs por <i>stem-loop RT-PCR</i>	34
5.4.6. Predição de alvos para miRNAs e desenho do <i>primers</i>	35
5.4.7. Extração de RNA e síntese de cDNA para os Alvos.....	36
5.4.8. Expressão dos Alvos miRNAs por RT-PCR.....	36
5.5. Análise estatística dos dados.....	37

6. Resultados e Discussão	38
6.1. Análise de expressão gênica dos miRNAs	38
6.2. Predição dos alvos	44
6.3. Análise de expressão gênica dos alvos preditos	44
7. Conclusões	47

1. INTRODUÇÃO

O café é uma *commodity* de grande importância econômica mundial, e sua cadeia produtiva gera milhões de empregos em diversos seguimentos desde o cultivo, processamento até a comercialização. O Brasil é responsável por 35% da produção mundial e destaca-se como maior produtor, com 2.158 milhões de hectares de área plantada e estimativa de colheita para 2018/19 de 47,5 milhões de sacas de café Arábica (*Coffea arabica* L.) e 14,2 milhões de café Conilon (*Coffea canephora* P.) (CONAB, 2018).

Dentre as espécies de café cultivadas destaca-se a *Coffea arabica* L. por apresentar melhor qualidade sensorial da bebida, representando quase 60% de toda a produção (ICO, 2018). Seu valor comercial é baseado em parâmetros qualitativos, o que demanda condições de manejo mais rigorosas nas diferentes etapas de cultivo como: suprir demandas nutricionais, manejo de pragas, mais de uma colheita, processamento pós-colheita visando assegurar a obtenção de um produto com qualidade superior, acarretando na elevação do custo de produção (VAN DER VOSSSEN *et al.*, 2015; WINTGENS, 2009).

Apesar dos intensos esforços para o desenvolvimento de cultivares com melhores características agronômicas, os cafeeiros apresentam um importante problema na assincronia da floração, o que provoca o amadurecimento desigual dos frutos e, portanto, afeta a qualidade final do produto. A floração do cafeeiro não é controlada apenas por um fator isolado mas por um conjunto complexo de sinalizações que envolve, por exemplo, fotoperíodo, vernalização e o potencial hídrico da planta (MAJEROWICZ *et al.*, 2005).

Em meio ao conjunto de fatores que estão associados à irregularidade no florescimento do cafeeiro, a mudança do potencial hídrico desempenha um importante papel na antese. Devido à complexidade do desenvolvimento floral do cafeeiro este é dividido em seis fases, que denominadas de G1 a G6 conforme o seu tamanho, FL que corresponde as flores totalmente abertas e F1, F2 correspondentes a desenvolvimento dos chumbinhos. O período de déficit hídrico corresponde à etapa na qual as gemas florais no estágio G4 iniciam um estado de dormência e por meio do início do período chuvoso ou irrigação abundante retomam o seu crescimento até atingir o estágio G6 e finalmente, a antese. Este tipo de estratégia é amplamente mencionado na literatura como uma forma para concentrar a florada em um único evento (ALVIM, 1960 *et al.*, 1992; GUERRA *et al.*, 2005; RONCHI *et al.*, 2015).

No entanto, os mecanismos fisiológicos responsáveis por essa sinalização ainda não são

totalmente claros. Crisosto et al. (1992) propôs que ocorrem mudanças por meio da sinalização química da raiz para a parte aérea após um período de seca seguido por reidratação, sugerindo que alguns mensageiros químicos, como os fitormônios, sejam capazes de estimular os botões florais aptos á antese, estimulando a floração. O etileno tem sido apontado como uma das moléculas sinalizadoras para os botões florais na fase G4 retomem seu desenvolvimento até a antese (LIMA, 2015; SANTOS, 2016).

Sabe-se que os fitormônios atuam em diversos processos fisiológicos, inclusive na transição do estado vegetativo para o reprodutivo (JAISWAL; KUMAR; LAL, 1985; METZGER, 1995). O etileno é um fitormônio que está envolvido em diversas fases do desenvolvimento vegetal, relacionando-se também com a resposta das plantas sobre diferentes condições de estresses bióticos e abióticos (ABELES; MORGAN; SALTVEIT JR, 2012). Quando relacionado ao florescimento, o etileno mostra-se como regulador desse evento, inibindo ou induzindo a antese (ACHARD *et al.*, 2007; TRUSOV; BOTELLA, 2006).

Assim como os fitormônios, os miRNAs também desempenham um papel importante na regulação do desenvolvimento floral, mais especificamente na regulação de genes de identidade floral, no desenvolvimento de órgãos sexuais e no tempo de floração (ACHARD, P. *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2009). Os miRNAs têm se destacado em estudos onde surgem como reguladores chave das vias de resposta a fitormônios nas plantas, afetando o seu metabolismo, distribuição e percepção (CURABA; SINGH; BHALLA, 2014; ZHANG *et al.*, 2011; ZUO *et al.*, 2012). Com o auxílio das técnicas de sequenciamento em larga escala foi possível identificar miRNAs responsivos ao etileno em diferentes espécies como em arroz (LIU, Q. *et al.*, 2009a), rosas (PEI *et al.*, 2013), cevada (BAI, B. *et al.*, 2017a) e tomate (WANG, YUNXIANG *et al.*, 2017).

Um recente trabalho desenvolvido em nosso grupo de pesquisa identificou em bibliotecas de RNAseq construídas a partir gemas de café em estágio G4 e G5, genes MIR potencialmente envolvidos no desenvolvimento floral do café (FERNANDES-BRUM, 2017). A partir desses resultados, com intuito de explorar o modo em que os miRNAs atuam na antese do cafeeiro e a sua relação com o etileno, esse trabalho teve como objetivos, avaliar os efeitos da aplicação do inibidor da ação do etileno (1-MCP) sobre a expressão dos miRNAs miR157a-5p, miR395a-3p, miR396a-3p, prever seus alvos através da análises de bioinformática e avaliar a expressão dos alvos em plantas sob diferentes condições hídricas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

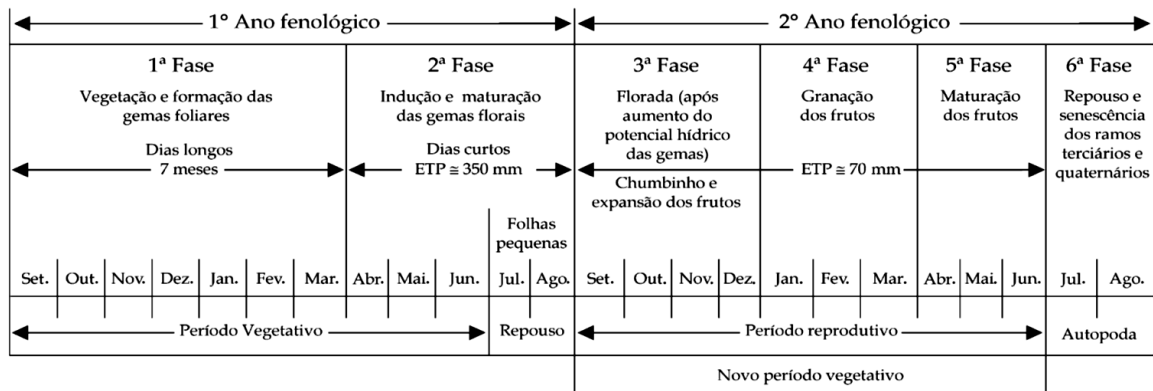
2.1. Caracterização da espécie de estudo

O café é uma dicotiledônia perene pertencente à família Rubiaceae do gênero *Coffea*. Embora o gênero contenha mais de 124 espécies, apenas duas possuem importância econômica: *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (DAVIS *et al.*, 2011; GUERREIRO-FILHO *et al.*, 2008). *C. arabica* é nativo do continente africano e originalmente encontrado no sudoeste da Etiópia, no Sudão e no norte do Quênia. As áreas ideais para cultivo do café são geralmente acima de 600 metros de altitude em zonas temperadas (DAVIS *et al.*, 2012).

O ciclo fenológico do cafeeiro, em especial do *C. arabica*, é compreendido em dois anos e dividido em seis fases (Figura 1). No começo do primeiro ano há formação dos ramos vegetativos e gemas axilares nos nós, durante os meses de dias mais longos. A diferenciação das gemas florais começa entre os meses de abril a agosto com fotoperíodo inferior a 13 horas (CAMARGO; CAMARGO, 2001). Entretanto, alguns autores discordam dessa afirmativa e acreditam que a indução de gemas vegetativas ocorre entre os meses de janeiro e fevereiro (GOUVEIA, 1984; MAJEROWICZ; SONDAHL, 2005). Quando as gemas florais atingem o estágio de maturação, entram em um estado de dormência, que é a fase que coincide com o inverno no hemisfério sul que é caracterizado pela ausência de chuvas na maior parte da região cafeeicultora do Brasil (sudeste), como consequência, as plantas apresentam um baixo potencial hídrico. As plantas permanecem nesse estado de dormência até que ocorra o choque hídrico com o início das chuvas. Embora esse seja o principal fator que desencadeia a florada, um aumento significativo na umidade relativa do ar também pode desencadear a quebra da dormência (CAMARGO; CAMARGO, 2001; CAMARGO; FRANCO, 1981; MAJEROWICZ; SONDAHL, 2005).

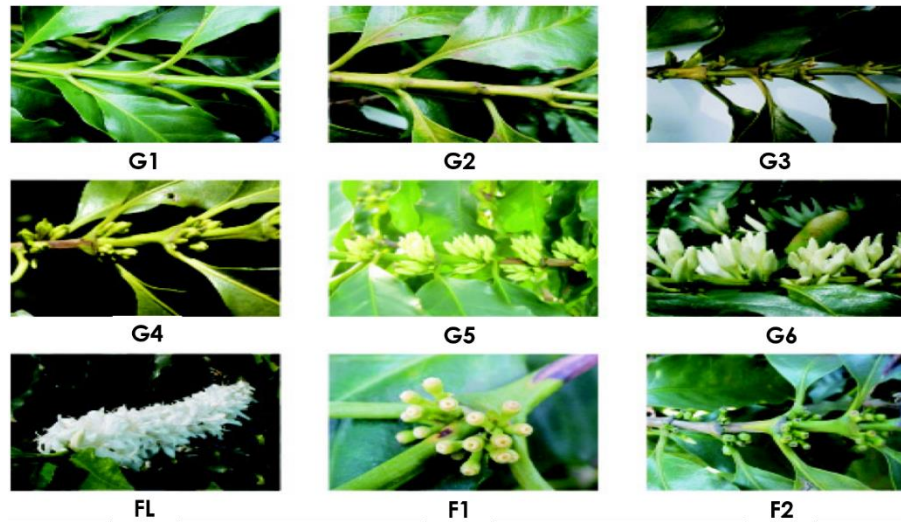
O segundo ano fenológico inicia-se com a florada seguida da formação dos chumbinhos, que precedem a expansão dos grãos até atingir o tamanho adequado para a maturação. A última fase do segundo ano fenológico é a senescência dos ramos plagiotrópicos terminais, que é o processo conhecido como auto-poda do café (CAMARGO; CAMARGO, 2001).

Figura 1 - Fases fenológicas do cafeeiro Arábica nas condições climáticas do Brasil



Dentro da escala fenológica do cafeeiro, a fase reprodutiva compreende a última fase do primeiro ano e as três primeiras do segundo ano fenológico (CAMARGO; CAMARGO, 2001). Devido à complexidade do florescimento do cafeeiro, algumas etapas foram subdivididas. A floração foi dividida em indução floral, diferenciação floral, dormência e antese (RENA *et al.*, 1986). O desenvolvimento da gema floral foi dividido de acordo com o tamanho das gemas, onde G1 corresponde aos nós com gemas indiferenciadas, G2 os nós com gemas intumescidas, G3 gemas com até 3 mm de comprimento, G4 gemas medindo 3,1 a 6 mm, G5 gemas de 6,1 a 10 mm com coloração verde claro, G6 gema maior que 10 mm e coloração branca (Figura 2). Na fase FL ocorre a abertura das flores, tendo duração de três dias, no primeiro dia há a abertura das flores no início da manhã, no segundo a murcha e no terceiro a queda das flores. A fase F foi dividida de acordo com o tamanho dos frutos e a M de acordo com a coloração (MORAIS *et al.*, 2008)

Figura 2 - Escala das fases de desenvolvimento floral de *Coffea arabica* com ênfase na fase G.



Legenda: Nós indiferenciadas (G1), nós com gemas entumecidas (G2), gemas até 3 mm (G3), gemas de 3,1 a 6 mm (G4), gemas de 6,1 a 10 mm (G6), gemas maiores que 10 mm (G6), flores abertas (FL) e formação dos chumbinhos (F1 e F2).

Fonte: adaptado de Morais et al. (2008).

A combinação dos eventos climáticos, período de estiagem seguido da reidratação com início do período chuvoso, favorece o desenvolvimento da gema até o estágio G4, no qual ela está fisiologicamente apta para passar pelo período de dormência e ser capaz de responder a diferentes estímulos, como por exemplo, a variação hídrica (CAMARGO; CAMARGO, 2001; RENA; BARROS, 2004). A resposta das gemas no estágio G4 pode estar vinculada ao desenvolvimento de um feixe vascular com maior quantidade de xilema secundário, permitindo uma elevada interação dessas gemas com estímulos provenientes da raiz durante o período de restrição hídrica (CRISOSTO *et al.*, 1992).

2.2. Florescimento: aspectos moleculares

O florescimento marca a transição da fase vegetativa para fase reprodutiva no desenvolvimento vegetal sendo caracterizada por uma série de modificações morfofisiológicas reguladas pela interação entre fatores endógenos e exógenos. Diferentes rotas já foram identificadas e relacionadas com o florescimento como o fotoperíodo e vernalização, que são fatores exógenos, e vias autônomas como idade da planta e a regulação hormonal via giberelina

(GA), como rotas endógenas (GUO, H. *et al.*, 1998; POSÉ *et al.*, 2012; SRIKANTH *et al.*, 2011)

Existe uma complexa sinalização atribuída a cada uma das rotas e a integração destes sinais coordenam a atividade gênica conduzindo a conversão do meristema apical para o meristema de inflorescência (Ó'MAOILÉIDIGH; GRACIET; WELLMER, 2014). A família genica *MADS-box* é composta por genes fundamentais que atuam na percepção e controle dos sinais que induzem ao florescimento. O gene *FLOWERING LOCUS T (FT)*, em arábido, está envolvido na via de percepção à fotoperíodo, e juntamente com outros genes, como: *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)*, *FLOWERING D (FD)* e *AGAMOUS-LIKE 24 (AGL24)*, os quais formam complexos proteicos que promovem direta ou indiretamente a expressão de genes de identidade floral (POSÉ; YANT; SCHMID, 2012; YAMAGUCHI; ABE, 2012). Os fatores de transcrição *FLOWERING LOCUS C (FLC)* e *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* (LIU, C.; THONG; YU, 2009) são genes que atuam regulando a identidade do meristema floral como a proteína *APETALA1 (API)* e o fator de transcrição *LEAFY (LFY)*, o *APETALA2 (AP2)*, necessários para a formação das pétalas (ABELES; MORGAN; SALTVEIT JR, 2012; LOHMANN; WEIGEL, 2002; SU *et al.*, 2013), os genes *API* e *LFY* são ativados por sinais indutivos florais que envolvem várias proteínas do domínio *MADS-box*, como, *SOC1*, *FRUITFULL (FUL)* e *AGL24* (LEE, J. *et al.*, 2008; LI, D. *et al.*, 2008; MICHAELS *et al.*, 2003).

O cafeeiro possui padrões específicos de expressão dos membros da família *MADS-box*, acredita-se que este perfil de expressão seja responsável por algumas especificidades do cafeeiro em relação ao desenvolvimento floral. Por exemplo, a falta da expressão de *CaAPI* no primórdio da pétala pode apontar para uma origem de pétalas derivada do estame no café, indicando que estes órgãos são conectados (estame epipétalo) no final (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014). A expressão dos genes repressores da floração, *CaFLC* e *CaSVP-1*, durante o desenvolvimento de flores, especificamente do gene *CaFLC*, sugere o envolvimento destes genes na dormência de gemas florais (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Uma característica comum em espécies arbóreas de regiões temperadas é a capacidade de manter em estado de dormência gemas vegetativas e reprodutivas, neste estado o meristema e gemas são insensíveis a sinais de promoção de crescimento, esta estratégia ajuda a planta a sobreviver ao inverno rigoroso (COOKE; ERIKSSON; JUNTILA, 2012; ROHDE; BHALERAO, 2007). A regulação da dormência em gemas é um processo complexo que é necessário para o desenvolvimento, produtividade, adaptabilidade, sobrevivência e distribuição

da planta (CHUINE; BEAUBIEN, 2001). Alguns genes da família MADS-box estão associados a dormência, DORMANCY ASSOCIATED MADS-box factors (DAM) são homólogos aos fatores de transcrição *SVP* e *AGL24* em *A. thaliana* (COOKE; ERIKSSON; JUNTILLA, 2012). Em *A. thaliana* o *SVP* atua inibindo a floração através da regulação negativa do *FT* enquanto o *AGL24* promove a floração através da regulação positiva do *LFY* (HARTMANN *et al.*, 2000; MICHAELS *et al.*, 2003). A expressão de genes relacionados com DAM foi verificada em diversas espécies que apresentam dormência das gemas, tais como pera japonesa (*Pyrus pyrifolia*) (NIU *et al.*, 2015), framboesa (*Rubus idaeus L.*) (MAZZITELLI *et al.*, 2007), damasco japonês (*Prunus persica*) (YAMANE *et al.*, 2011), dentre outras. O conhecimento sobre os mecanismos de regulação da indução, manutenção e liberação da dormência podem fornecer a base para a solução de problemas na produção agrícola relacionados a dormência de algumas culturas (ANDERSON *et al.*, 2010).

2.3. Etileno, 1-MCP e o controle do florescimento do cafeeiro

O etileno é um fitormônio gasoso que atua como regulador do crescimento e desenvolvimento vegetal. O etileno é uma molécula de dois carbonos (C₂H₄) produzida naturalmente em todos os tecidos das plantas superiores e, por se tratar de um composto volátil, é facilmente difundido. Esse fitormônio está relacionado a processos como florescimento, maturação de frutos, senescência, abscisão e respostas a estresses ambientais (ABELES; MORGAN; SALTVEIT JR, 2012; CHEN, Y. F.; ETHERIDGE; SCHALLER, 2005; TANG *et al.*, 2008).

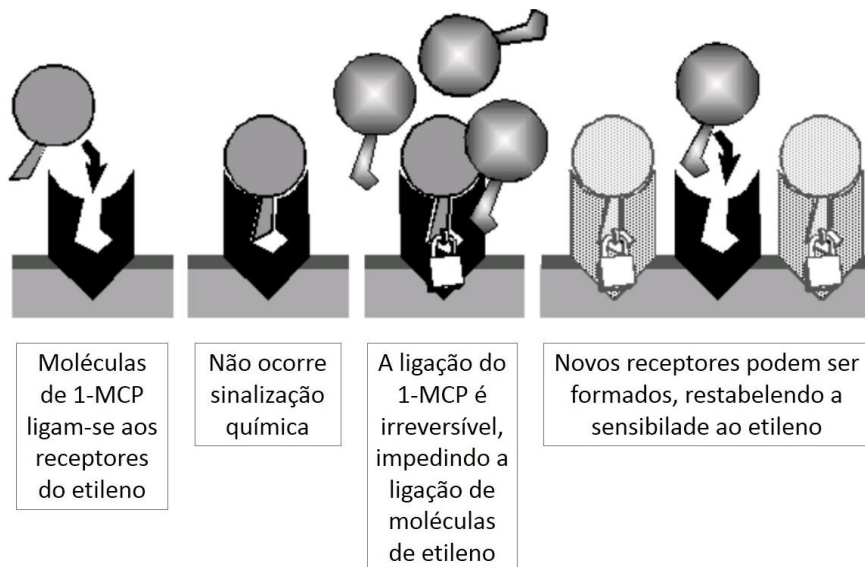
A rota de biossíntese do etileno compreende a conversão da metionina em S-adenosilmetionina (SAM) em 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) pela enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintase (ACS) e o etileno é produzido quando o ACC é oxidado pela enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase (ACO) (KERBAUY, 2004; MIYAZAKI; YANG, 1987; WANG, K. L.-C.; LI; ECKER, 2002).

Os fitorreguladores são substância sintéticas que influenciam no balanço hormonal das plantas e produzem efeitos fisiológicos semelhantes às classes hormonais conhecidas. O 1-metilciclopropeno (1-MCP) é utilizado como inibidor do etileno em uma ampla gama de vegetais e seu mecanismo de ação é caracterizado pela ligação competitiva aos receptores do

etileno, impedindo a ligação do fitormônio (BLANKENSHIP, S. M.; DOLE, 2003). A afinidade do 1-MCP com o receptor é, aproximadamente, 10 vezes maior que a do etileno (SISLER; SEREK, 1997) e suas moléculas são ativas em concentrações mais baixas que a do hormônio. A ação deste inibidor resultando na redução das repostas fisiológicas da planta ao fitormônio (BURNS, 2008; SISLER; SEREK, 1997). No entanto, novos receptores podem ser sintetizados, acarretando na retomada da sensibilidade da planta ao etileno (BLANKENSHIP, S., 2001; BLANKENSHIP, S. M.; DOLE, 2003)(Figura 3).

Em cafeeiro, o 1-MCP foi capaz de promover a antese dos botões florais em estágio G4 (LIMA, 2015; SANTOS, 2016). Além disso, o 1-MCP promoveu o aumento de genes relacionados à rota da biossíntese e sinalização do etileno em folhas e gemas com picos de expressão após duas horas de sua pulverização. Isto indica que, possivelmente há aumento rápido e transitório nos níveis de etileno na parte aérea que induz a florada nessa espécie (SANTOS, 2016).

Figura 3 - Ligação competitiva do 1-metilciclopropeno (1-MCP) aos receptores de etileno associados às membranas celulares.



Fonte: adaptado de Blankenship (2001).

2.4. miRNAs; biogênese e função biológica em plantas

Os miRNAs (miRNAs) fazem parte de uma classe de pequenos RNAs endógenos de 20 a 24 nucleotídeos que regulam a expressão gênica, classe que também incluem os *small*

interfering RNAs (siRNAs) ou RNA interferente (RNAi). Estes atuam no silenciamento mediado por RNA, controlando a expressão em um nível pós transcricional. Apesar de serem bioquimicamente semelhantes, diferem entre si em sua biogênese. Os miRNAs são transcritos a partir dos genes de miRNA (MIR) enquanto os siRNAs são produtos da clivagem de outros RNAs (VOINNET, 2009; WANG, H. V; CHEKANOVA, 2016; ZHAO *et al.*, 2016).

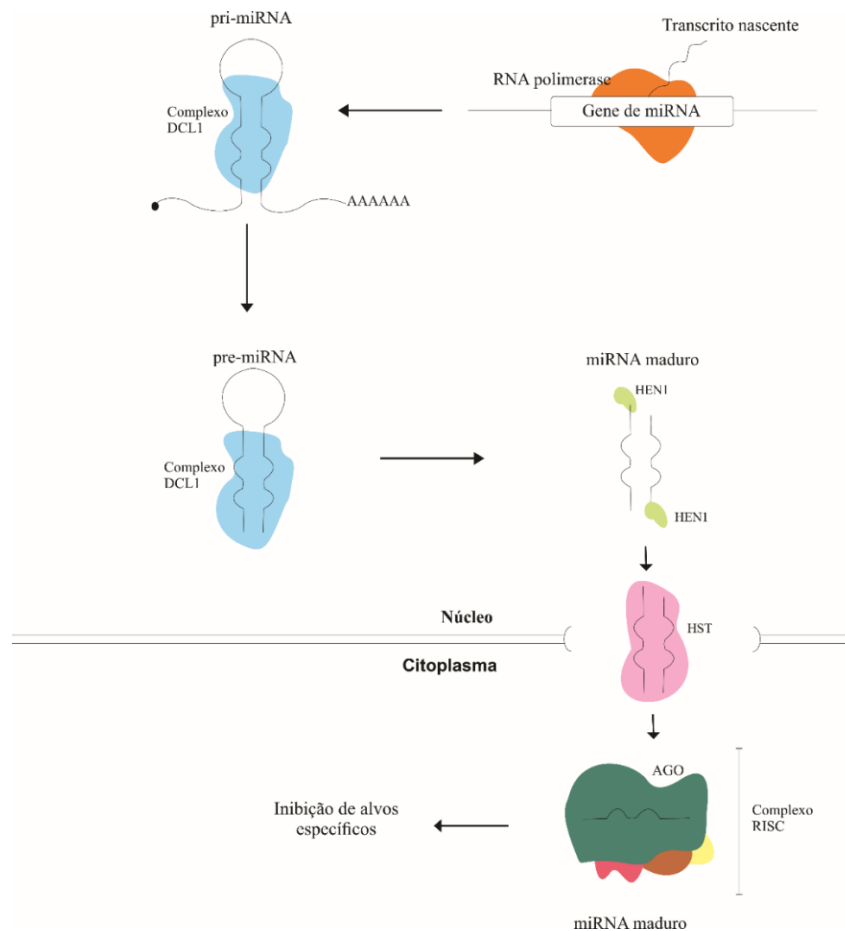
Em plantas, os miRNAs controlam a expressão de genes que codificam fatores de transcrição, proteínas de resposta ao estresse e outras genes que afetam o desenvolvimento, o crescimento e a fisiologia das plantas. Os genes de miRNA (MIR) em plantas são transcritos pela RNA polimerase II e estão localizados em regiões intergênicas (ROGERS; CHEN, 2013). Encontrados em clusters no genoma, sua forma madura é altamente complementar ao seus alvos de RNA, sendo seus principais alvos os fatores de transcrição (GRIFFITHS-JONES *et al.*, 2008; LIU, H. *et al.*, 2014; MERCHAN *et al.*, 2009). Em geral, a biogênese de miRNA nas plantas inclui a transcrição do gene MIR, processamento, modificação e transferência para o complexo RISC (Complexo de Silenciamento Induzido por RNA), o qual determina o nível de miRNAs maduros encontrados na célula (ROGERS; CHEN, 2013).

Os miRNAs primários (pri-RNAs) são moléculas 5' capsulados e poliadenilados parcialmente na extremidade 3, estão sujeitos a modificações pós transcricionais similares às dos mRNAs (ROGERS; CHEN, 2013) e são auto-complementares formando estruturas secundárias conhecidas como *hairpins* (CHEN, XUEMEI, 2009). Os pri-RNAs são processados em miRNAs percusores (pré-miRNAs) ainda no núcleo por uma endonuclease, a DICER-LIKE 1 (DCL1). Com o auxílio de outras proteínas capazes de ligar-se a RNAs de cadeia dupla (dsRNA), HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) e SERRATE (SE) formando o complexo DCL1-HYL1-SERRATE (CHEN, XUEMEI, 2009; REN; CHEN; YU, 2012). A molécula de pré-miRNA é processada pelo enzima DCL1, formando uma estrutura de duplex composta por 21-24 nucleotídeos, sendo as estruturas com 21 nucleotídeos mais abundantes (KÄLLMAN *et al.*, 2013).

O duplex contém dois nucleotídeos na extremidade 3' projetados lateralmente. A estrutura em duplex é então metilada nas suas extremidades pela ação da enzima metiltransferase HUA ENCHANCER1 (HEN1) e essa metilação é essencial para a proteção da extremidade 3' contra ação de exonucleases (RAMACHANDRAN; CHEN, 2008). Sua cadeia é finalmente transportada para o citoplasma pela proteína HASTY (HTS) (AXTELL; WESTHOLM; LAI, 2011) onde uma das cadeias do duplex é carregada e incorporada a proteína ARGONAUTA (AGO), que contém os domínios PAZ e PIWI formando o complexo de RISC

(RNA-induced silencing complex) (BUDAK; AKPINAR, 2015; ROGERS; CHEN, 2013) (Figura 3). A seleção da cadeia guia é em parte dependente da estabilidade termodinâmica da extremidade 5' (BUDAK; AKPINAR, 2015). O miRNA guia o complexo RISC para se ligar ao seu alvo por complementariedade da sequência, direcionando a clivagem da sequência de mRNA ou impedindo a tradução (ROGERS; CHEN, 2013).

Figura 4 - Biogênese de miRNAs em plantas



O transcrito do gene MIR é sintetizado pela enzima POL II e forma uma estrutura de grampo (pri-miRNA). Em seguida, o pri-miRNA é clivado pelo complexo DCL1 em pré-miRNA e depois novamente para formar um duplex. O duplex é metilado por HEN1 e depois é transportado para o citoplasma pela enzima HST. No citoplasma, um dos braços (miRNA maduro) é incorporado ao complexo RISC.

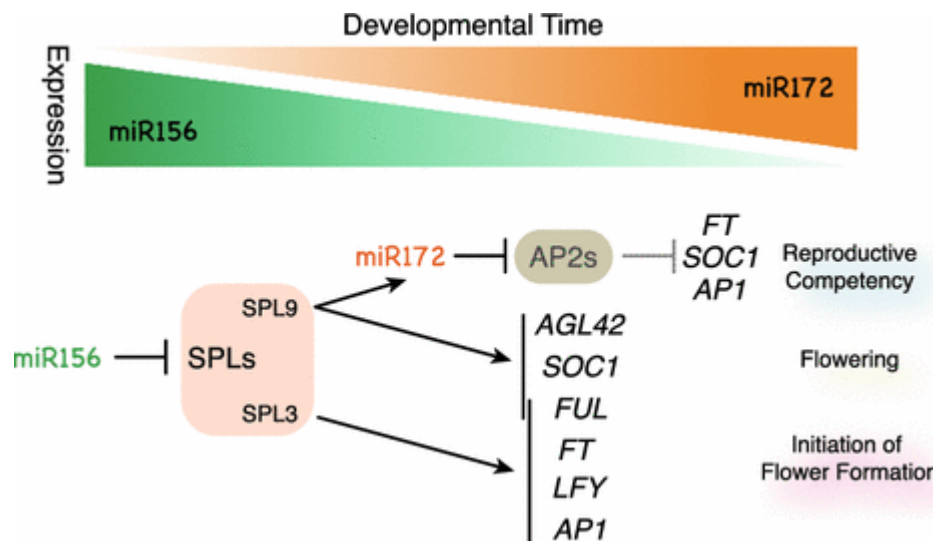
Fonte: Adaptado de Yamaguchi e Abe (2012) por Rezende (2017).

2.5. miRNAs no desenvolvimento floral

Os miRNAs participam da regulação do tempo do florescimento e formação e desenvolvimento de órgãos florais (ACHARD *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2005). Algumas famílias conservadas de miRNA, miR156, miR157, miR172, miR160, miR395, miR396 são descritas como tendo algum papel na floração, o que envolve transição floral, padrões florais e o desenvolvimento de órgãos florais.

Os miR156 e miR172 são altamente conservados e seus alvos foram identificados como componentes chave do controle da transição entre as fases juvenil para a adulta (Aukerman & Sakai, 2003) (Figura 4). miR156 atua inibindo os fatores de transcrição *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPLs)* (WANG, J. W.; CZECH; WEIGEL, 2009). A família de fatores de transcrição *SPLs* controlam uma gama de aspectos fundamentais para o crescimento e desenvolvimento de plantas, incluindo a mudança da fase vegetativa, tempo de floração, ramificação e taxa de iniciação foliar (PRESTON; HILEMAN, 2013; YANG, Z. *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2010). A expressão do miR156 é maior durante a fase juvenil e diminui à medida que a planta se desenvolve, promovendo a mudança de fase (SILVA *et al.*, 2014; WANG, J.-W. *et al.*, 2011). A expressão do miR172 é oposta ao do miR156, uma vez que os alvos do miR156 são fatores de transcrição da família *SPLs* que atuam como ativadores da expressão do miR172, que por sua vez regula negativamente a expressão de um pequeno grupo de fatores de transcrição do tipo *APETALA2-like (AP2-like)* promovendo a expressão dos genes *FT*, *SOC1* e *API* (AUKERMAN; SAKAI, 2003a; YAMAGUCHI; ABE, 2012). O miR172 atua na transição de fases e na especificação da identidade dos órgãos florais (CHUCK *et al.*, 2007; NAIR *et al.*, 2010; ZHU, Q.; HELLIWELL, 2011).

Figura 5 - Transição da fase vegetativa para reprodutiva mediada por miR156 e miR172



A atividade antagônica de miR156 e miR172 na via do envelhecimento. Os níveis de miR156 declinam à medida que as plantas se tornam mais velhas. Por outro lado, os níveis de miR172 aumentam à medida que as plantas se tornam mais velhas. Entre os 11 genes *SPL* alvos do miR156, o *SPL9* é responsável pela *up-regulation* do miR172, que resulta na redução da atividade do fator de transcrição do tipo AP2, permitindo que as plantas adquiram competência para responder a estímulos adequados do ambiente para florescer. Além do miR172, o *SPL9* também pode regular diretamente a *SOC1*, *FUL* e *AGL42*, um parálogo de *SOC1*. Alvos do *SPL3*; *FUL*, *FT*, *LFY* e *AP1*, também são bem caracterizados.

Fonte: (YAMAGUCHI; ABE, 2012)

Os miRNAs também atuam no processo de dormência de gemas, em álamo (*Populus*) o miR156 e o miR172 mostraram padrões de expressão opostos na transição da dormência (DING *et al.*, 2014). O miR160 foi relatado como envolvido na via de sinalização de auxina e foi expresso especificamente durante a liberação de endodormência por resfriamento (DING *et al.*, 2014). Em *Pyrus pyrifolia*, o miR6390 teve como alvo genes *PpDAM* e estes apresentam padrões de expressão opostos, indicando que miR6390 poderia desempenhar um papel crucial na liberação de dormência via degradação de *PpDAM* (NIU *et al.*, 2015).

miR157 e miR156 diferem em apenas três nucleotídeos e apresentam funções similares, uma vez que a superexpressão dos miRNAs em *A. thaliana* resultam em plantas com fenótipo parecido, com um alto grau de ramificações e atraso na transição da fase vegetativa para a fase reprodutiva, (SHIKATA *et al.*, 2009). Como já mencionado anteriormente, as famílias gênicas MIR156/157 tem como alvos genes da família *SPLs* (REINHART *et al.*, 2002; RHOADES *et al.*, 2002). Em *A. thaliana* os genes da família *SPL* regulados por miR156/157 foram caracterizados e divididos em três grupos distintos: 1) *SPL2*, *SPL9*, *SPL10*, *SPL11*, *SPL13* e *SPL15* que contribuem para a transição da fase vegetativa juvenil para adulto, sendo *SPL9*,

SPL3 e *SPL15* os genes mais importantes para esses processos 2) *SPL3*, *SPL4* e *SPL5* que promovem a transição da identidade do meristema floral; 3) *SPL6* que apesar de não ter uma função principal na morfogênese da parte aérea, pode ser importante para certos processos fisiológicos (LIU, N. *et al.*, 2017).

A superexpressão do miR157 em algodão (*Gossypium hirsutum*) apresentou um papel na regulação do crescimento de órgãos florais e na produção de óvulo, regulando negativamente cinco genes da família *SPL* e dois fatores de transcrição MADS-box, que são ortólogos de *AtAGL6* (*AGAMOS-LIKE 6*) e *SITDR8* (*MADS-box transcription factor TDR8*) (LIU, N. *et al.*, 2017). A sinalização de auxina também foi atenuada com a superexpressão do miR157, indicando que a regulação miR157/SPL pode regular os fatores de transcrição MADS-box e afetar a transdução do sinal da auxina (LIU, N. *et al.*, 2017).

O miR395 é caracterizado por ser responsivo a deficiência de sulfato controlando a assimilação deste nutriente, apresentando como alvos ATP suforilases (ATPS) e transportadores de sulfato de baixa afinidade em *A. thaliana* (KAWASHIMA *et al.*, 2009; MATTHEWMAN *et al.*, 2012). Entretanto o miR395 é reportado em bibliotecas obtidas a partir de gemas e flores de *Prunus mume*, apresentando expressão variável em função do estágio de desenvolvimento da gema, sendo *upregulated* em flores que apresentavam imperfeições morfológicas, indicando que esse miRNA participa do desenvolvimento do pistilo (WANG, T. *et al.*, 2014). Em *Sorghum belongs* foi sugerido um possível envolvimento do miR395 no tempo de floração, porém sem detectar alvos envolvidos no desenvolvimento floral (CALVIÑO *et al.*, 2011).

O miR396 é um miRNA que desempenha um papel importante, regulando a expressão dos Fatores Reguladores do Crescimento (*GRFs*), que se trata de uma classe de fatores de transcrição (DEBERNARDI *et al.*, 2012). A regulação intermediada por miR396/*GRF* é um ponto de controle central no processo de desenvolvimento de plantas como desenvolvimento de raízes, organogênese floral e desenvolvimento de sementes (DEBERNARDI *et al.*, 2012; RODRIGUEZ *et al.*, 2010; WANG, L. *et al.*, 2010). O miR396 teve como alvo identificado em *Catharanthus roseus* um fator de transcrição do domínio MADS-box, *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*), impedindo a tradução (YANG, C.-Y. *et al.*, 2015). O *SVP* por sua vez funciona como regulador negativo do desenvolvimento floral como parte de um complexo formado com o *FLC*, controlando o tempo de floração, regulando negativamente *FT* e *SOC1* (IRISH, 2010; J. H. LEE *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2008). O acúmulo deste miRNA foi induzido pela seca em plantas de tabaco e plantas transgênicas superexpressando este miRNA apresentaram melhor

tolerância à seca, com capacidade de conservação da água através da redução da área foliar e do índice estomático (YANG, F.; YU, 2009).

Em cafeeiro, já foram identificados e caracterizados 235 precursores e 317 miRNAs maduros, pertencentes a 113 famílias MIR, incluindo miR157, miR395 e miR396, no genoma *C. canephora* (FERNANDES-BRUM, 2017). Em bibliotecas geradas a partir de gemas no estágio G4 e G5 de *C. arabica*, miRNAs dessas famílias foram identificados apresentando expressão diferencial - miR157a-5p, miR395a-3p, miR396a-3p (FERNANDES-BRUM, 2017). O estudo de miRNAs voltados para o desenvolvimento floral propiciam um melhor entendimento de diferentes processos, como tempo de floração, desenvolvimento de flores, dormência, antese e outros aspectos.

2.6. Ação de fitormônios e miRNAs na regulação do desenvolvimento

Os fitormônios controlam a maioria dos estádios de desenvolvimento, se não todos, ao longo do ciclo de vida da planta e muitas vezes o mesmo processo envolve múltiplos fitormônios. A comunicação entre as vias de sinalização dos fitormônios é essencial para integrar e coordenar adequadamente múltiplos processos de desenvolvimento (como a germinação, morfogênese, transição de fases e senescência) em resposta a estímulos endógenos e exógenos (idade, fotoperíodo, temperatura, estresses bióticos e abióticos) (CURABA *et al.*, 2014).

Como exemplo de regulação e *crosstalk* entre fitormônios, podemos mencionar o etileno, que atua estimulando a biossíntese e transporte da auxina através da regulação positiva de vários genes de biossíntese de auxina e genes que codificam seus carreadores (VANSTRAELEN *et al.*, 2012). Além disso, estudos sugerem que o controle da expansão celular pela via etileno/auxina envolve citocinina e ácido jasmônico, que estimulam a sinalização de etileno através da ativação de dois genes *1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE SYNTHASE (ACS)* (CHAE; FAURE; KIEBER, 2003) e *ETHYLENE INSENSITIVE 3 (EIN3)* (ZHU, Z. *et al.*, 2011). O ACS é um gene que codifica uma enzima limitante da taxa de biossíntese do etileno que é induzida durante o processo de liberação da endodormência (BAI *et al.*, 2013).

Os miRNAs como o miR156, miR172 e miR396 estão envolvidos no *crosstalk* hormonal conectam a via da auxina com as vias do ácido abscísico ou etileno (CURABA; SINGH; BHALLA, 2014). A evolução das plantas terrestres exigiu uma adaptação às mudanças ambientais como, mudança de estações e resistência ao estresse, para as quais a comunicação entre auxina e ácido abscísico/etileno (hormônios relacionados ao estresse) foi essencial, sugerindo que miRNAs foram parte do caminho evolutivo que levou à adaptação ao estresse das plantas (CURABA; SINGH; BHALLA, 2014).

O miR159 está envolvido no tempo de floração atuando na via da giberelina (GA) e também regula o desenvolvimento de anteras pela modulação de um regulador transcricional específico para GA o *GAMYB-like* (ACHARD *et al.*, 2004). A via miR159/*GAMYB-like* também atua no desenvolvimento das anteras e no receptáculo floral (Achard *et al.*, 2007). Os fatores de transcrição *TCP*, alvos do miR319, podem integrar sinais hormonais, ambientais e de desenvolvimento para modular vários processos biológicos (Li *et al.*, 2015). Outra forma de regulação da expressão gênica se dá por meio da interação entre vias reguladas por miRNAs durante o desenvolvimento floral, como é o caso das vias miR159/*GAMYB-like* e miR319/*TCP* que podem regular a via miR167/*ARF*. O miR167 regula positivamente os Fatores de Resposta a Auxina *ARF6* e *ARF8*, que atuam na formação de órgãos florais, e sua expressão depende dos alvos de miR159 e miR319 (RUBIO-SOMOZA; WEIGEL, 2013). Para o miR169 foi demonstrado haver uma regulação de fatores de transcrição em resposta à auxinas, *ARF17* (*Auxin Response Factor 17*) (MALLORY; BARTEL; BARTEL, 2005).

Diversos estudos vêm mostrando que os miRNAs estão envolvidos na transdução da sinalização hormonal em plantas ligado ao etileno (CHEN, L. *et al.*, 2012), como os miR159, miR156, miR 390, miR164, miR 319 e miR396 em cevada (BAI, B. *et al.*, 2017b), miR159 e miR394 em arroz (LIU, Q. *et al.*, 2009b).

3. HIPÓTESE

Os microRNAs miR157-5p, miR395a-3p e miR396a-3p são responsivos à aplicação de 1-MCP em gemas de cafeeiro em estágio G4.

4. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da aplicação de 1-MCP sobre a expressão de microRNAs miR157-5p, miR395a-3p, miR396a-3p em gemas de cafeeiro em estágio G4, assim como caracterizar os possíveis alvos destas moléculas, em plantas sob diferentes condições hídricas.

4.1. Objetivos específicos

- Avaliar a expressão gênica dos microRNAs ccp-miR157-5p, ccp-miR395a-3p, ccp-miR396a-3p pelo método *stem-loop* RT-PCR em gemas florais de café sob estresse hídrico e sem estresse hídrico, com e sem aplicação de 1-MCP.
- Predizer os alvos dos microRNAs selecionados no genoma de *Coffea canephora*, utilizando a ferramenta psRNATarget
- Avaliar a expressão gênica dos alvos preditos por RT-qPCR.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Local, período experimental e material vegetal

A coleta do material biológico para o experimento ocorreu na Fazenda Milano (OLAM Agrícola Ltda), localizada na Rodovia BR 020/242 KM 835, Zona Rural, Barreiras - BA, no período de 21 a 23 de Agosto de 2017. Foram utilizadas plantas de oito anos de idade da cultivar Catuaí Vermelho IAC 144. As análises de expressão gênica e predição de alvos para miRNAs 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.

5.2. Tratamentos e delineamento experimental

O experimento foi composto por 3 grupos de plantas, um grupo de plantas sob estresse hídrico, cuja irrigação foi suspensa por 36 dias (potencial hídrico foliar de -1,5 à -2,0 Mpa) e

outro grupo de plantas bem hidratadas (potencial hídrico foliar de -0,4 à -0,6 Mpa). Ambos os grupos receberam dois tratamentos, T0 e T1, sendo T0 o grupo controle, sem aplicação de produto e T1 com aplicação de 1-MCP (produto comercial Harvista™ - AgroFresh). Para T1, utilizou-se 150g de ingrediente ativo (i.a.) /ha do Harvista™. Para isso, diluiu-se 78 mL do Harvista™ (formulação líquida) em 4L de água para 20 plantas, sendo que cada planta recebeu 200 mL de calda, com o auxílio de um pulverizador costal de 12L (S12 - Brudden Pulverizadores) logo após a preparação das soluções. A pulverização foi efetuada na planta inteira abrangendo folhas (região adaxial e abaxial) e gemas. Após a pulverização do produto, o grupo de plantas sob estresse hídrico teve sua irrigação retornada.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 6 tratamentos e 3 repetições biológicas, sendo cada repetição biológica composta por 5 plantas, totalizando 20 plantas por tratamento. Quatro linhas, denominadas blocos, agruparam as repetições biológicas e entre cada bloco existia uma linha de plantas 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.

5.3. Coleta do material

Para as análises de expressão gênica, coletaram-se gemas no estágio G4, de acordo com Moraes et al. (2008), de ramos plagiotrópicos, preferencialmente no terço médio das plantas. O material foi coletado em tubos plásticos de 50 mL, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e em seguida armazenados em ultrafreezer -80 °C até o momento das análises. A Tabela 1 mostra a nomenclatura utilizada nas amostras.

Tabela 1 - Descrição das abreviações utilizadas nas amostras.

Abreviação	Descrição
PD	Plantas déficit hídrico
PR	Plantas completamente re-irrigadas
PI	Plantas constantemente irrigadas
T0	Tratamento controle, sem aplicação de 1-MCP
T1	Tratamento com aplicação de 1-MCP

5.4. Análise da expressão gênica

5.4.1. Extração de RNA e tratamento com DNase

As gemas florais foram inicialmente maceradas em gral com nitrogênio líquido com auxílio de um pistilo e em seguida foram armazenados 100 mg de material vegetal em microtubos de 1,5 mL. A extração de RNA foi realizada utilizando o *PureLink® RNA Mini Kit* seguindo as recomendações do fabricante para tecidos vegetais com algumas alterações.

Para o tratamento com DNase, utilizou-se a enzima *RNase free DNase Set* (Qiagen). Adicionou-se 80 µL de uma mistura previamente preparada da enzima (10 µL de DNase + 70 µL de tampão DDR) à coluna de filtragem e incubou-se a mistura a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, continuou-se a etapas de lavagem, adicionando-se 350 µL do tampão I à coluna, centrifugando-se por 15 segundos a 12.000 x g a temperatura ambiente e descartando o fluxo contínuo. Adicionou-se 500 µL do tampão II à coluna, centrifugou-se por 15 segundos a 12.000 x g a temperatura ambiente e descartou-se o fluxo contínuo. Repetiu-se as lavagens com os tampões I e II e centrifugou-se a amostra por 2 minutos para completa secagem. Para a eluição do RNA, transferiu-se as colunas de filtragem para novos tubos, adicionou-se 15 µL da água livre de RNase contida no kit, incubou-se por 1 minuto a temperatura ambiente e por fim, centrifugou-se por 2 minutos a 12.000 x g. Repetiu-se esta etapa, para que fosse obtido volume final de 30 µL de RNA. As amostras foram armazenadas em freezer -20 °C até as análises posteriores.

5.4.2. Quantificação e análise da qualidade do RNA

Após a extração do RNA, as amostras foram quantificadas e analisadas quanto à presença de contaminantes utilizando-se o espectrofotômetro *NanoVue®* (GE Healthcare). Utilizou-se 1,5 µL de cada amostra para realizar essa análise, observando-se as relações de pureza A260\280 e A260\230, priorizando-se, preferencialmente, valores entre 1,8 e 2,0.

Para avaliar a integridade do RNA extraído, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose (0,7%), corado com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* (Sigma Aldrich) e visualizado em fotodocumentador UV-transiluminador (UVITEC FireReader XS D-77Ls-20. M). Para obtenção do RIN (*RNA integrity number*), foi utilizado o sistema *Agilent 2100*

Bioanalyzer (Agilent Technologies), seguindo as recomendações do fabricante para RNA de plantas, padronizando as amostras para aproximadamente 400 ng/ μ L. Foram utilizados apenas os RNAs que apresentaram RIN acima de 7.

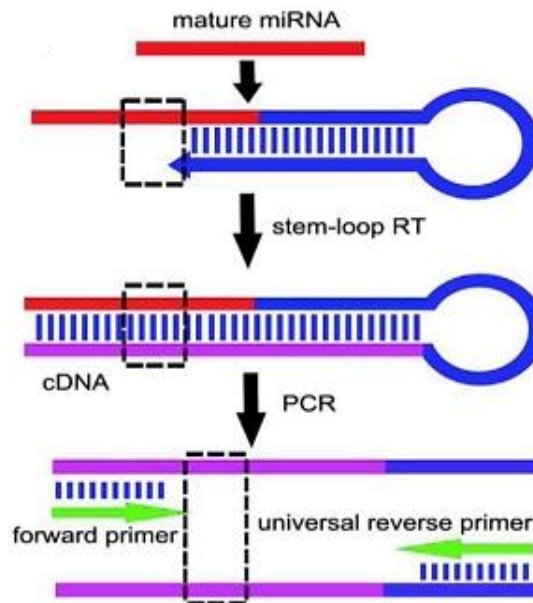
5.4.3. Seleção dos miRNAs

As sequências dos miRNAs escolhidos foram identificadas em *Coffea arabica* por Fernandes-Brum (FERNANDES-BRUM, 2017), com base na expressão diferencial de miRNAs entre as fases G4 e G5 de gemas florais de café. Foram selecionados membros de 3 famílias MIRs: ccp-miR157-5p, ccp-miR395a-3p, ccp-miR396a-3p.

5.4.4. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi feita a partir do método *stem-loop RT-PCR* descrito por Chen et al. (2005) (Figura 6). Para a amplificação dos miRNAs, foram desenhados 3 *primers*. O primeiro, *primer stem-loop* ou RT, possui 50 nucleotídeos, dos quais 44 são iguais para todos os *primers* e os outros 6 são complementares à região 3' de cada miRNA. Esse *primer* tem a capacidade de formar uma estrutura em formato de grampo, denominada *hairpin*, em baixas temperaturas. O segundo *primer*, *forward*, é igual ao miRNA alvo, porém sem as bases que se anelam ao *hairpin* e com adição de uma extensão na extremidade 5' com função termodinâmica. O terceiro *primer*, reverso, é universal, pois sua sequência é complementar a parte fixa do *primer stem-loop*. As sequências dos *primers* desenhados foram analisadas utilizando a ferramenta *Oligo Analyzer 3.1* (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>).

Figura 6 - Amplificação de miRNAs por *stem-loop*-RT-PCR



O *primer stem-loop* se anela ao miRNA para a síntese de cDNA (*Step 1*), em seguida o *primer forward* se liga a sequência do miRNA e o *primer* reverso universal se liga a região do *primer stem-loop* para que a qPCR ocorra (*Step 2*).

Fonte: Gao et al. (2012).

Para a síntese de cDNA, utilizou-se apenas o *primer stem-loop*, e para cada dois miRNAs a serem analisados, sintetizou-se um cDNA diferente. A síntese de cDNA foi feita a partir do RNA tratado, utilizando-se o kit *ImProm-II™ Reverse Transcriptase* (Promega). Para o mix 1, foram utilizados 1000 ng de RNA, 1 µL de dNTP mix, 2 µL de *primer* RT específico para cada miRNA e 1 µL de *primer oligodT*, para essa mistura as condições no termociclador foram 70 °C por 10 minutos e 4 °C por 10 minutos. Para o mix 2, foram utilizados 5 µL de *Buffer*, 2,4 µL de MgCl₂, 0,6 µL de *RNaseOut* e 1 µL da enzima *Improm-II*, para essa mistura as condições no termociclador foram: início a 16 °C por 30 minutos, 60 vezes a 30 °C por 30 segundos, 42 °C por 30 segundos, 50 °C por 1 segundo e finalização a 75 °C por 15 minutos.

5.4.5. Expressão dos miRNAs por *stem-loop* RT-PCR

As análises da expressão dos miRNAs escolhidos (ccp-miR157-5p, ccp-miR396a-3p e ccp-miR395a-1-3p) 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 *Master Mix SYBR Green* (QuantiNova *SYBR Green PCR Kit* - Qiagen), *primers* ccp-miR157-5p, ccp-miR396a-3p e ccp-miR395a-1-3p todos a

concentração de 2,0 μ M (3,0 μ L da solução de trabalho a 10 μ M), 1,5 μ L de cDNA na diluição 1/5.

Foram utilizadas três repetições biológicas de cada tratamento, sendo utilizadas triplicatas técnicas para cada uma das amostras. As condições de ciclagem utilizadas foram: 5 minutos a 95 °C para ativação da enzima, seguidos de 40 ciclos de 5 segundos a 95 °C e 10 segundos a 60 °C, com uma rampa de *melting* para se avaliar a especificidade da reação de 55 °C a 95 °C, com o aumento de 1 °C a cada 5 segundos. A eficiência de amplificação dos *primers* dos genes alvos e de referência foi determinada por meio de curva de diluição (Tabela 2).

Tabela 2 - – Sequência de primers e eficiência da amplificação por stem-loop RT-PCR.

Genes/miRNA	Primer RT (5' - 3')	Primer Foward (5' - 3')	Primer Reverse (5' - 3')	Eficiência de amplificação (%)	R ²
ccp-miR157-5p	GTCGTATCCAGT GCAGGGTCCGA GGTATTCGCACT GGATACGACGT GCTC	GGGCGTTGA CAGAAGATA GA	GTGCAGGGT CCGAGGT	100	0,99
ccp-miR395a-1-3p	GTCGTATCCAGT GCAGGGTCCGA GGTATTCGCACT GGATACGACGG AGTT	GTCTACTGA AGTGTTTGG GGG	GTGCAGGGT CCGAGGT	105	0,99
ccp-miR396a-3p	GTCGTATCCAGT GCAGGGTCCGA GGTATTCGCACT GGATACGACCA TCCC	GAGCCGTTC AATAAAGCT GT	GTGCAGGGT CCGAGGT	108	0,99
AP47	-	GGTGTACGC TCACCATTTT CATC	AGCCAACAG CACCAGTAA CTTG	97	0,99
RPL39	-	GCGAAGAAG CAGAGGCAG AA	TTGGCATTGT AGCGGATGG T	91	0,99

5.4.6. Predição de alvos para miRNAs e desenho do primers

Sequências alvo dos miRNAs selecionados foram preditas usando a ferramenta *psRNATarget* (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/analysis?function=3>) utilizando os parâmetros *default* (padrão). Para buscar os alvos dos miRNAs, as bibliotecas de RNA foram coletadas de arquivos GFF (CDS+UTR) do projeto genoma de *Coffea canephora* (<http://coffee-genome.org/>). Foram selecionadas as sequências respectivamente para cada miRNA que apresentaram o *Expectation* < 2.5 (unidade de medida da provável ligação e clivagem do

miRNA com alvo). Em seguida o código identificador da sequência foi pesquisado no projeto genoma de *Coffea canephora* identificado a sua sequência para desenho dos *primers*. As sequências dos *primers* desenhados foram analisadas utilizando a ferramenta *Oligo Analyzer* 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Para verificar a especificidade do primer foi utilizado a ferramenta *Primer Blaster* disponível projeto genoma de *Coffea canephora* (http://coffee-genome.org/primer_blaster).

5.4.7. Extração de RNA e síntese de cDNA para os alvos

A extração de RNA para todos os tecidos foi realizada utilizando Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen). Todas as amostras foram tratadas com o Kit Turbo DNA-free (Ambion) para a remoção total de DNA genômico. O Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) foi utilizado para a síntese de cDNA a partir de 1000 ng de RNA.

5.4.8. Expressão dos alvos miRNAs por RT-PCR

As análises da expressão dos genes alvos dos miRNAs escolhidos (ccp-miR157-5p alvo SQUAMOSA PROMOTER-BINDING-LIKE protein 2 (SPL2), ccp-miR395a-1-3p alvo SULFATE TRANSPORTER 2;1 like (SULTR2) e ccp-miR396a-3p alvo G-TYPE LECTIN S-RECEPTOR-LIKE SERINE (GsSRK) 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 *Master Mix SYBR Green* (QuantiNova *SYBR Green PCR Kit* - Qiagen), *primers forward* e *reverse*, 1,5 µL de cDNA na diluição 1/5 e o restante do volume completado com água livre de RNase.

Foram utilizadas três repetições biológicas de cada tratamento, sendo utilizadas triplicatas técnicas para cada uma das amostras. As condições de ciclagem utilizadas foram: 5 minutos a 95 °C para ativação da enzima, seguidos de 40 ciclos de 5 segundos a 95 °C e 10 segundos a 60 °C, com uma rampa de *melting* para se avaliar a especificidade da reação de 55 °C a 95 °C, com o aumento de 1 °C a cada 5 segundos. A eficiência de amplificação dos *primers* dos genes alvos e de referência foi determinada por meio de curva de diluição (Tabela 3).

Tabela 3 – Sequência de primers e eficiência da amplificação por RT-PCR.

miRNA	Gene	Acesso	Sequência do <i>Primer</i> (5' - 3')	Conc. (µM)	E (%)	R ²
ccp-miR157-5p	Squamosa promoter-binding-like protein 2	Cc11_g16990 ^b	PF:ACCAGAGCCCATATCGTT PR:CGATCTGCCAGTATTCCG	1,0	92	0,99
ccp-miR395a-1-3p	Sulfate transporter 2;1 like (SULTR2)	Cc07_g15540 ^b	PF:CCTTGAACGAGAGAGGGA PR:GGGGAACTGAGAGAGAT	1,5	98	0,99
ccp-miR396a-3p	G-type lectin S-receptor-like serine – (GsSRK)	Cc01_g03960 ^b	PF:TACTGGAGAAAAGGGGAGC PR:TGTACTTGTCGTCTGGATCA	1,5	100	0,99
-	<i>AP47</i>	DV690764.1 ^a	PF:GGTGTACGCTCACCATTTTCATC PR:AGCCAACAGCACCAGTAACTTG	1,5	97	0,99
-	<i>RPL39</i>	GT720707.1 ^a	PF:GCGAAGAAGCAGAGGCAGAA PR:TTGCATTGTAGCGGATGGT	2,0	91	0,99

^a - Número de acesso NCBI; ^b - Número de acesso projeto genoma de *Coffea canephora*; Conc. – concentração em µM do *primer*; E – eficiência do *primer* (%).

5.5. Análise estatística dos dados

A análise estatística da expressão dos miRNAs e genes alvos foram realizadas utilizando os modelos lineares e mistos conforme proposto por Steibel et al. (2009). Os Cqs foram corrigidos segundo a eficiência de cada primer comparando a expressão de um gene de referência (normalizador) em cada uma das condições estudada.

No ajuste, foram considerados as plantas (repetições) como efeito aleatório, considerando, seguindo o seguinte modelo:

$$y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \delta_{k(ij)} + \varepsilon_{ijkl}$$

em que:

y_{ijkl} representa o valor observado da variável resposta Cq no i -ésimo tratamento, no j -ésimo gene, na l -ésima réplica da k -ésima repetição para $i=1, \dots, 6, j=1,2, k=1,2,3$ e $l=1,2,3$.

μ representa uma constante comum a todas as observações;

α_i representa o efeito do i -ésimo nível do fator tratamento;

β_j representa o efeito do j -ésimo gene

$(\alpha\beta)_{ij}$ representa o efeito da interação i -ésimo nível do fator tratamento e o j -ésimo gene;

$\delta_{k(ij)}$ representa o efeito aleatório da k -ésima planta dentro da combinação j -ésimo gene e do i -ésimo tratamento, com $\delta_{k(ij)} \sim N(0, \delta^2)$.

ε_{ijkl} representa o erro aleatório, sendo que o valor de erros $\varepsilon_{ijkl} \sim N(0, \sigma_\delta^2)$

Foram consideradas para o modelo misto, diferentes matrizes de variâncias e covariâncias residuais para que se pudesse modelar a heterogeneidade de variâncias e a correlação entre as medidas repetidas presentes no experimento.

Para cada estimativa de $\Delta\Delta Cq$ foram obtidos o erro padrão e o intervalo de confiança de 95% como apresentado por (STEIBEL *et al.*, 2009). Os valores estimados de $\Delta\Delta Cq$ foram utilizados na fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$ como sugerido por (STEIBEL *et al.*, 2009), para se obter as estimativas das razões. Para cada estimativa da razão obtida, foram calculados intervalos de confiança de 95% utilizando o erro padrão (EP) da estimativa de $\Delta\Delta Cq$. Os limites superior e inferior dos intervalos de confiança para a razão foram calculados, por aproximação, como sugerido por (BENÍTEZ *et al.*, 2015; GONZÁLEZ-CALVO *et al.*, 2014; JAISWAL; KUMAR; LAL, 1985), utilizando a seguinte expressão.

$$IC = 2^{-(\Delta\Delta Cq \pm t_{\alpha/2} \times EP)}$$

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Análise de expressão gênica dos miRNAs

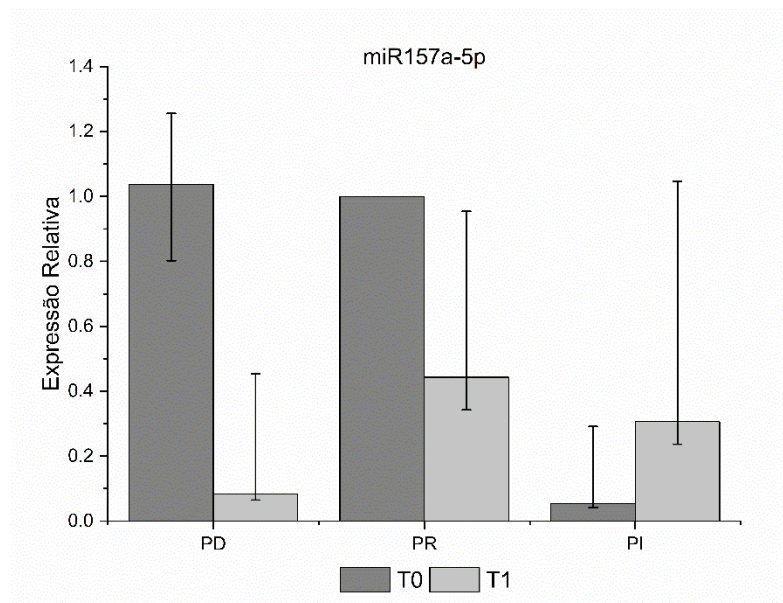
O miR157 atua na transição entre as fases vegetativa e reprodutiva, é altamente similar ao miR156, juntos formam a família miR156/157 (HE, 2017a; LIU, N. *et al.*, 2017; WANG, *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2016).

Ao observar a expressão *miR157a-5p* apenas em relação à condição hídrica, pode-se observar que não há diferença de expressão entre as plantas que estavam sob restrição hídrica e aquelas que foram reirrigadas (PDT0 x PRT0), enquanto que, as plantas que foram mantidas constantemente irrigadas (PIT0) obtiveram a menor expressão do *miR157a-5p* (Figura 7). No processo de florescimento essa família de miRNAs tem como principal alvo as proteínas

SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (*SPL*), que constituem uma família diversificada de fatores de transcrição que desempenham papéis fundamentais no crescimento e desenvolvimento das plantas regulando a transcrição de genes da família MADS-Box (PRESTON *et al.*, 2013; WANG, *et al.*, 2009). Os genes APETALA1 (*API*), FRUITFULL (*FUL*) e SUPPRESSOR OF CONSTANS OVEREXPRESSION 1 (*SOCI*), foram descritos como diretamente induzidos por *SPLs*, que por sua vez, tem sua expressão regulada negativamente por miR156/157 (WANG, J. W.; CZECH; WEIGEL, 2009; XU *et al.*, 2016).

Em *Arabidopsis thaliana* os níveis dos miR156/157 declinam à medida que a transição de fases ocorre, e por consequência há o aumento das proteínas *SPLs*, que promovem a transição da fase juvenil para adulta e posteriormente favorecem a transição para fase reprodutiva através da ativação dos genes *MIR172*, *LFY*, *API*, *FT* e *SOCI* (HE, 2017b; YAMAGUCHI; ABE, 2012). Ao observar o padrão de expressão do *miR157a-5p*, sua maior expressão no tratamento PDT0 comparado a PIT0, podemos sugerir que a família miR156/157 participa da manutenção do estado de dormência dos botões florais de cafeeiro durante o período de restrição hídrica. Ao regular a expressão da família *SPLs*, e por consequência dos genes da família MADS-box envolvidos na sinalização para que ocorra o completo desenvolvimento das gemas e consequente antese.

Figura 7 - Gráfico de expressão gênica relativa para o microR157a-5p



Legenda: PD - Plantas em déficit hídrico; PR - Plantas re-irrigadas PI - Plantas constantemente irrigadas; T0 - Tratamento controle, sem aplicação de 1-MCP; T1 - Tratamento com aplicação de 1-MCP; PRT0 - Amostra calibradora; Barra representa o intervalo de confiança a 95%.

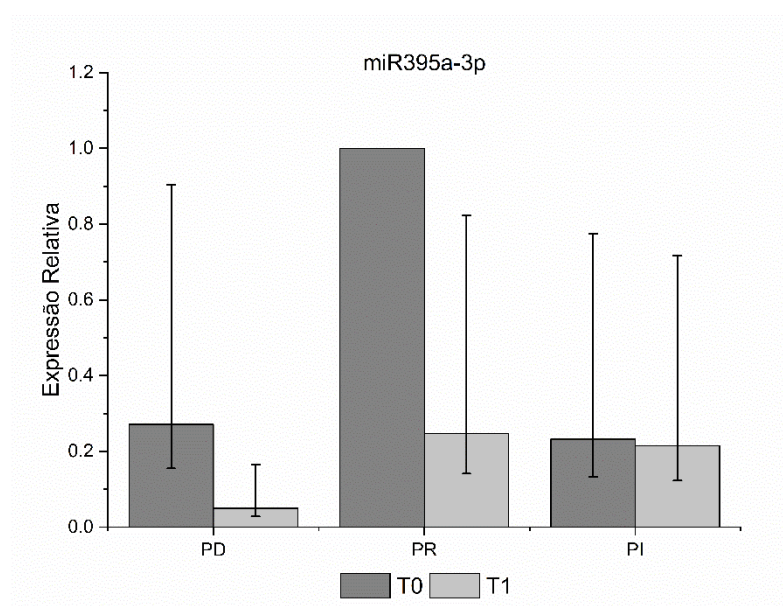
O baixo nível de expressão em plantas constantemente irrigadas indica que o *miR157a-5p* participa da manutenção das gemas em estado de dormência até que as condições sejam favoráveis para que ocorra a antese.

As plantas que receberam tratamento com 1-MCP sob as diferentes condições hídricas descritas anteriormente não apresentaram diferença na expressão do *miR157a-5p* entre si (Figura 7). Porém, quando comparadas com as plantas controle observou-se diferença na expressão para as plantas sob estresse hídrico (PDT1). Elas apresentaram expressão 0,92 vezes menor em relação à amostra calibradora (PRT0) e de 0,36 vezes menor em relação à amostra controle (PDT0), indicando que a aplicação de 1-MCP reduziu a expressão do *miR157a-5p* nas plantas sob déficit hídrico podendo supostamente participar da sinalização que induz a antese das gemas florais em estágio G4.

Sabe-se que as vias de sinalização hormonal interagem no nível de expressão gênica (CHENG, X. *et al.*, 2013). Uma estratégia comum do *crosstalk* é controlar elementos-chave específicos de vias de sinalização de outros hormônios (SANTNER *et al.*, 2009). A exemplo, podemos mencionar a ligação entre o etileno e auxina, onde o etileno estimula a regulação positiva de genes que participam da biossíntese e carreadores de auxina (VANSTRAELEN *et al.*, 2012).

Para o *miR395a-3p* não há diferença significativa entre tratamentos T0 e T1 nas plantas que passaram pelo estresse hídrico. No entanto, este miRNA foi cerca de 0,8 vezes menos expresso nas plantas T1 em relação a T0 na condição re-irrigada e não houve diferença entre os tratamentos nas plantas que estavam constantemente irrigadas. Também não há diferença de expressão deste miRNA quando comparamos o controle (T0) do grupo de plantas sob estresse hídrico (PD) com o constantemente irrigado (PI). Isso indica que o estresse hídrico e a aplicação do produto não interferem na expressão deste miRNA de forma considerável (Figura 8).

Figura 8 - Gráfico de expressão gênica relativa para o miR395a-3p



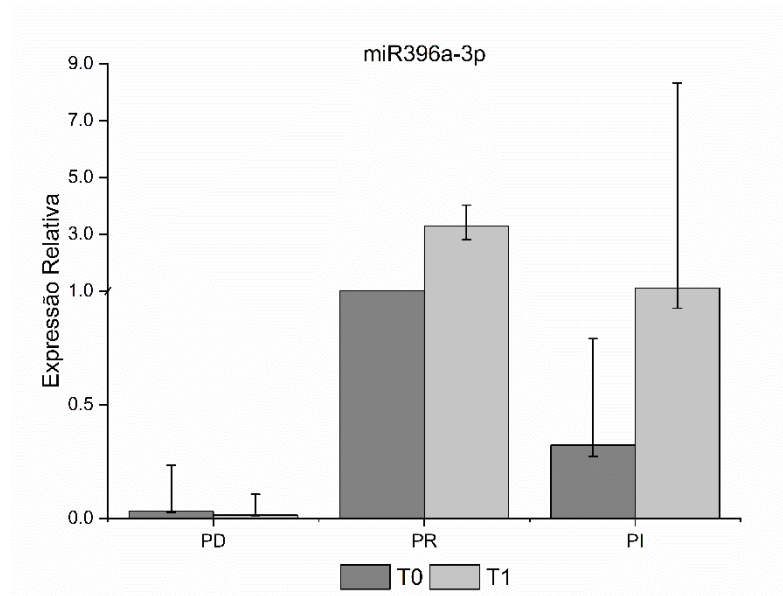
Legenda: PD - Plantas em déficit hídrico; PR - Plantas re-irrigadas PI - Plantas constantemente irrigadas; T0 - Tratamento controle, sem aplicação de 1-MCP; T1 - Tratamento com aplicação de 1-MCP; PRT0 - Amostra calibradora; Barra representa o intervalo de confiança a 95%.

O miR395 foi identificado em diversas bibliotecas de miRNAs derivados de botões florais ou flores em várias espécies como California Poppy (*Eschscholzia californica*) (BARAKAT *et al.*, 2007), Rosas (*Rosa hybrida*) (PEI *et al.*, 2013), nogueira (*Carya cathayensis*) (WANG, Z. J. *et al.*, 2012), ameixa chinesa (*Prunus mume*) (WANG, T. *et al.*, 2014), batata doce (*Sweet Potato*) (SUN *et al.*, 2015) e sorgo (*sweet sorghum*) (CALVIÑO *et al.*, 2011) e café (*C. canephora*) (FERNANDES-BRUM, 2017). A expressão do miR395 foi relacionada ao tempo de floração em sorgo, indicando que a alta expressão do miR395 seria necessária para a floração (CALVIÑO *et al.*, 2011). Em *Prunus mume* a expressão do miR395 foi entre os estágios de gema e flor não foi significativa, indicando que o miR395 não é necessário para a abertura das flores (WANG, T. *et al.*, 2014). Entretanto quando este miRNA é *upregulated* em flores, estas apresentavam imperfeições no pistilo, indicando que este miRNA possa estar envolvido no correto desenvolvimento do pistilo (WANG, T. *et al.*, 2014). Em flores nogueira (*Carya cathayensis*), Rosas (*Rosa hybrida*) e batata doce (*Sweet Potato*) o miR395 foi identificado como conservado e apresentando baixa expressão ou nula (PEI *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2015; WANG, Z. J. *et al.*, 2012). Os miRNAs conservados com baixa expressão podem ser importantes em processos de desenvolvimento de tecidos específicos como observado por (WANG, T. *et al.*, 2014) ou específicas da espécie (GRANT-DOWNTON *et al.*, 2009). A

expressão do miR395 nas plantas de cafeeiro PD e PI que receberam a aplicação de 1-MCP não é alterada, indicando que este não influencia na dormência, mas possivelmente a baixa expressão esteja relacionada a maturação reprodutiva da gema. As plantas PRT1 apresentaram redução na expressão do *ccp-miR395a-3p* indicando que nesse estágio de desenvolvimento o 1-MCP reforça a sinalização para que a gema retome o desenvolvimento para que ocorra a antese mediante a redução deste miRNA.

O miR396a-3p não apresentou diferença significativa entre tratamentos T0 e T1 apresentando expressão quase nula nas plantas que passaram pelo estresse hídrico (PD). No entanto, este miRNA foi cerca de 2,2 vezes mais expresso nas plantas T1 em relação a T0 na condição re-irrigada (PR) (calibradora). Houve diferença na expressão entre o tratamento nas plantas que estavam constantemente irrigadas (PI), em que a aplicação do 1-MCP promoveu a expressão do miR396a-3p em relação controle (PIT0), que apresentou expressão 0,2 menor que a amostra calibradora (PRT0) (Figura 9).

Figura 9 - Gráfico de expressão gênica relativa para o miR396a-3p



Legenda: PD - Plantas em déficit hídrico; PR - Plantas re-irrigadas PI - Plantas constantemente irrigadas; T0 - Tratamento controle, sem aplicação de 1-MCP; T1 - Tratamento com aplicação de 1-MCP; PRT0 - Amostra calibradora; Barra representa o intervalo de confiança a 95%.

O miR396 é um miRNA com função conservada que desempenha importantes papéis no desenvolvimento das plantas, controlando a expressão de Fatores Reguladores do Crescimento (*GRFs*) e regulando processos como o desenvolvimento de raízes, organogênese

floral e desenvolvimento de sementes (DEBERNARDI *et al.*, 2012; OMIDBAKHSHFARD *et al.*, 2015). Alguns membros da família miR396 foram relatados como envolvidos em estresse abiótico em *A. thaliana*, girassol (*Helianthus annuus*) e arroz (*Oryza sativa*) (GIACOMELLI *et al.*, 2012; LIU, H.-H. *et al.*, 2008; ZHOU *et al.*, 2010) incluindo tolerância a seca (YANG, F.; YU, 2009). Além de controlar *GRFs* e envolvimento com o estresse abiótico, foram identificados como alvo um fator de transcrição da família MADS-box, *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* em *Catharanthus roseus* (YANG, C.-Y. *et al.*, 2015). Em *Arabidopsis* o *SPV* funciona como um regulador negativo do desenvolvimento floral como parte de um complexo com o *FLC* para controlar o tempo de floração regulando negativamente o *FT* e *SOC1* ligando-se diretamente as suas sequências promotoras (LEE, J. H. *et al.*, 2007; LI, D. *et al.*, 2008).

Para as mesmas condições experimentais, o *ccp-miR396a-5p* apresentou uma maior expressão diferencial quando aplicado o 1-MCP em plantas de cafeeiro sob déficit hídrico (Oliveira, 2018). A escolha da fita é determinada durante o passo de recrutamento da ARGONAUTA (AGO) e sua escolha é baseada, principalmente, na estabilidade termodinâmica das duas extremidades do duplex do miRNA maduro (5p/3p) (GUO, L. *et al.*, 2014; KHVOROVA; REYNOLDS; JAYASENA, 2003). A seleção de um miRNA maduro (5p ou 3p) é sempre pensado com probabilidade desigual com base no mecanismo de seleção de ligações de hidrogênio (Griffiths-Jones *et al.*, 2006). Entretanto, outros trabalhos sugerem que diferentes braços podem ser selecionados em diferentes tecidos, fases de desenvolvimento e espécies (CHENG, W.-C. *et al.*, 2012; CLOONAN *et al.*, 2011; GRIFFITHS-JONES *et al.*, 2011; LI, S., 2015; MARCO *et al.*, 2010).

Ao comparar os tratamentos PR e PI com PD podemos observar um aumento significativo na expressão do *miR396a-3p*, e um aumento ainda maior nas plantas que receberam a aplicação de 1-MCP (T1). O miR396 apresenta como alvos os fatores de transcrição *GRFs* envolvidos na organogênese floral (DEBERNARDI *et al.*, 2012), a superexpressão deste gene em *Arabidopsis* provocou uma maior produção de pétalas e estames mais curtos (BAUCHER *et al.*, 2013). Este resultado sugere que este miRNA está envolvido com o estado de dormência das gemas em estágio G4, mais especificamente com a quebra da dormência, que ocorre após a re-hidratação da planta, sugerindo que este atue nos fatores de crescimento sinalizando o completo desenvolvimento dos órgãos floreaais, estando apitos para a antese.

6.2. Predição dos alvos

Para o *miR157a-5p*, 155 possíveis alvos foram indicados e destes, o que apresentou menor *expectation* (unidade que indica a maior probabilidade de ligação com o alvo e possível clivagem) foi o *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN 2 (SPL2)*. Foram identificados 149 possíveis alvos para o *miR395a-3p*, sendo o *SULTR2;1* o alvo com menor *expectation*. Este alvo também descrito em trabalhos que investigavam a ação do miR395 em condições de privação de sulfato (KAWASHIMA *et al.*, 2011; MATTHEWMAN *et al.*, 2012; YUAN *et al.*, 2016). Dentre os possíveis alvos indicados pela análise de bioinformática do miR396, foi identificado como mais provável alvo, uma proteína do tipo RECEPTOR-like KINASE (RLKs) do tipo G-type lectin S-receptor-like serine/threonine protein kinase (GsSRK) (Tabela 4).

Tabela 4 - miRNAs e Alvos, identificados utilizando o software psRNA Target.

miRNA	Sequência Alvo	mRNA Alvo	<i>Expectation</i>	miRNA maduro	Sequencia complementar no Genoma Cc
ccp- miR157a-5p	Cc00_g14640 ^a	SPL2	1.5	UUGACAGAA GAUAGAGAG CAC	GUGCUCUCUC UCUUCUGUCA A
ccp- miR395a-3p	Cc07_g15540 ^a	SULTR2;1	2.5	CUGAAGUGU UUGGGGGAA CUCC	UCAGUUCCCC CAAACUCUUC AA
ccp- miR396a-3p	Cc01_g03960 ^a	GsSRK	2.0	GUUCAUAA AGCUGUGGG AUG	GAUCCUACAG UUUUGUUGA AU

^a Número de acesso projeto genoma de *Coffea canephora*.

6.3. Análise de expressão gênica dos alvos preditos

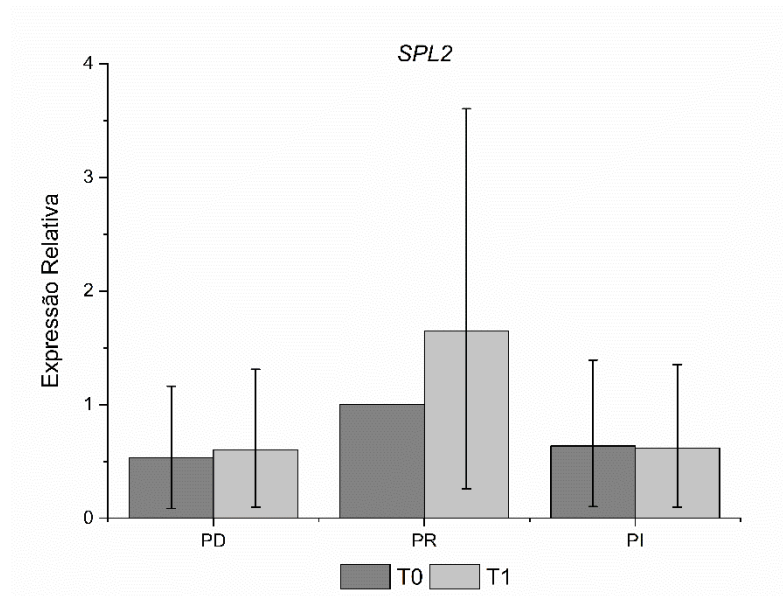
Para o SPL2 (alvo do miR157a-5p) não houve diferença significativa de expressão entre os tratamentos T0 e T1 (Figura 10) em nenhuma das três condições, nem mesmo quando comparamos o grupo de plantas que passou pelo estresse hídrico com o grupo de plantas que estava constantemente irrigado. Os genes da família *Squamosa-promoter binding protein (SBP)*-box ou (*SPLs*) codificam para uma família de fatores de transcrição específicos de

plantas que desempenham um papel importante no processo de transição de fases (CARDON *et al.*, 1999; CHEN, XIAOBO *et al.*, 2010; JONES-RHOADES *et al.*, 2004).

Os *SPLs* formam uma pequena família com 17 genes em *A. thaliana* (WANG, YI *et al.*, 2009), destes genes os *SPL2*, *SPL9*, *SPL10*, *SPL11*, *SPL13* e *SPL15* contribuem tanto para a transição vegetativa juvenil quanto para a adulta e transição reprodutiva, com *SPL9*, *SPL13* e *SPL15* sendo os mais importantes para esses processos (XU *et al.*, 2016). Em cafeeiro possivelmente o *SPL2* não seja alvo do miR157a-5p em gemas no estágio G4 em estado de dormência.

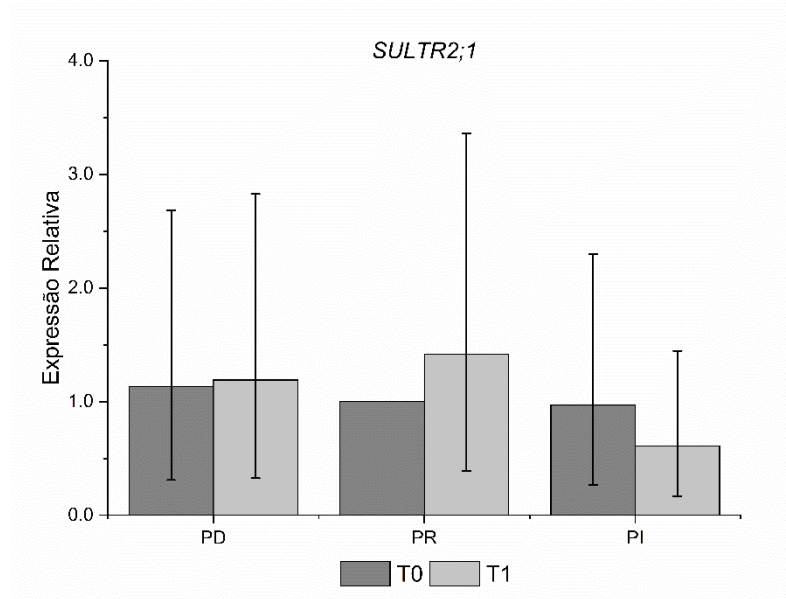
Não houve diferença na expressão para o *SULTR2;1* entre os tratamentos em nenhuma das condições descritas (Figura 11). Os trabalhos que buscam por alvos do miR395 durante o processo de florescimento e dormência identificaram genes relacionados a assimilação de sulfato (CALVIÑO *et al.*, 2011; WANG, T. *et al.*, 2014) como o gene *SULTR2;1* identificado como mais provável alvo deste miRNA para gemas de cafeeiro em estágio G4. Porém o papel deste alvo no florescimento não é elucidado na literatura.

Figura 10 - Gráfico de expressão gênica relativa para o *SPL2*



Legenda: PD - Plantas em déficit hídrico; PR - Plantas re-irrigadas PI - Plantas constantemente irrigadas; T0 - Tratamento controle, sem aplicação de 1-MCP; T1 - Tratamento com aplicação de 1-MCP; PRT0 - Amostra calibradora; Barra representa o intervalo de confiança a 95%.

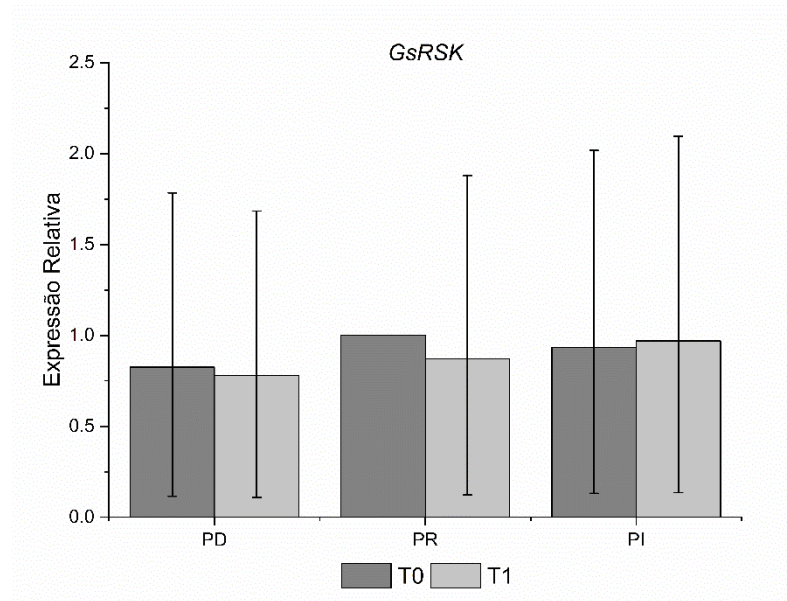
Figura 11 - Gráfico de expressão gênica relativa para o SULTR2;1



Legenda: PD - Plantas em déficit hídrico; PR - Plantas re-irrigadas PI - Plantas constantemente irrigadas; T0 - Tratamento controle, sem aplicação de 1-MCP; T1 - Tratamento com aplicação de 1-MCP; PRT0 - Amostra calibradora; Barra representa o intervalo de confiança a 95%.

Também não houve diferença na expressão entre os tratamentos em nenhuma das condições descritas para o gene *GsSRK* alvo predito do *miR396a-3p* (Figura 12). As proteínas Receptor-Like Quinases (*RLKs*) desempenham papéis vitais na detecção de sinais de estresses (ACHARD *et al.*, 2007; DOMBROWSKI; MARTIN, 2012; JAIN *et al.*, 2011). É relatado que os *RLKs* atuam ativamente em vários processos fisiológicos, como o crescimento e desenvolvimento de plantas (HÉMATY *et al.*, 2008; NIBAU; *et al.*, 2011), resposta de defesa a patógenos e estresse salino (YANG, X.; DENG; RAMONELL, 2012). A expressão de um gene é variável em função do órgão, tecido ou condição experimental em que se é avaliado (CHEN, L. *et al.*, 2011; ZENG *et al.*, 2014). O gene *GsSRK* não apresentou variação em sua expressão em botões florais de cafeeiro no estágio G4, sugerindo não ser alvo do *miR396a-3p* neste tipo de tecido e possivelmente, por ter sua resposta ligada a outros tipos de estímulos ambientais.

Figura 12 - Gráfico de expressão gênica relativa para o GsSRK.



Legenda: PD - Plantas em déficit hídrico; PR - Plantas re-irrigadas PI - Plantas constantemente irrigadas; T0 - Tratamento controle, sem aplicação de 1-MCP; T1 - Tratamento com aplicação de 1-MCP; PRT0 - Amostra calibradora; Barra representa o intervalo de confiança a 95%.

7. CONCLUSÕES

Os miRNAs aqui estudados apresentaram diferentes padrões de expressão entre os tratamentos. O *miR157a-5p* foi o único miRNA responsivo à aplicação de 1-MCP e apenas para a condição em que a planta se encontrava em estresse hídrico, indicando que a inibição dos receptores de etileno via 1-MCP possa participar do processo de quebra de dormência independente da irrigação.

O *miR395a-3p* teve uma pequena redução, próxima a diferença significativa a 5%, em sua expressão quando recebeu o tratamento com 1-MCP para as condições hídricas de PD e PR, sugerindo uma participação do etileno na regulação deste miRNA. Novos estudos são necessários para o entendimento deste no processo de dormência e indução da antese.

A expressão do *miR396a-3p* próxima de nula para PD, tanto em T0 quanto em T1, sinaliza que para essa condição o *miR396a-5p* possivelmente seja a principal escolha do complexo RISC. O aumento da expressão deste miRNA para as condições hídricas PR e PI

indica que este miRNA estava envolvido principalmente no processo de quebra de dormência das gemas de cafeeiro em estágio G4.

Quando as plantas mantidas em condições hídricas ótimas (PI), não há variação na expressão para os *miR157a-3p* e *miR395a-3p*, do mesmo modo o 1-MCP não influencia na expressão destes ou de seus respectivos alvos estudados neste trabalho.

Além disso, um estudo mais aprofundado como RACE ou análise de alvos clivados por sequenciamento a respeito dos alvos dos miRNAs deve ser realizado a fim de entender o mecanismo destes no processo de indução da antese em cafeeiro.

Os resultados desta pesquisa fornecem fundamentos para futuros estudos para o controle do florescimento em cafeeiro, utilizando de ferramentas biotecnológicas para a obtenção de plantas com maior produtividade.

REFERÊNCIAS

- ABELES, F. B.; MORGAN, P. W.; SALTVEIT JR, M. E. *Ethylene in plant biology*. [S.l.]: Academic press, 2012.
- ACHARD, P. *et al.* Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development*, v. 131, n. 14, p. 3357–3365, 2004.
- ACHARD, P. *et al.* The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 15, p. 6484–6489, 2007.
- ALVIM, P. D. T. Moisture Stress as a Requirement for Flowering of Coffee. *Science*, v. 132, n. 3423, p. 354–354, 1960.
- ANDERSON, J. V *et al.* Bud dormancy in perennial plants: a mechanism for survival. *Dormancy and resistance in harsh environments*. [S.l.]: Springer, 2010. p. 69–90.
- AUKERMAN, M. J.; SAKAI, H. Aukerman, Sakai - 2003 - Regulation of Flowering Time and Floral Organ Identity by a MicroRNA and Its APETALA2 -Like Target Genes *The Plant Cell*.pdf. v. 15, n. November, p. 2730–2741, 2003a.
- AUKERMAN, M. J.; SAKAI, H. Regulation of Flowering Time and Floral Organ Identity by a MicroRNA and Its APETALA2 -Like Target Genes *The Plant Cell*. v. 15, n. November, p. 2730–2741, 2003b.
- AXTELL, M. J.; WESTHOLM, J. O.; LAI, E. C. Vive la différence : biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. p. 1–13, 2011.
- BAI, B. *et al.* microRNAs participate in gene expression regulation and phytohormone cross-talk in barley embryo during seed development and germination. *BMC Plant Biology*, v. 17, n. 1, p. 1–16, 2017a.
- BAI, B. *et al.* microRNAs participate in gene expression regulation and phytohormone cross-talk in barley embryo during seed development and germination. *BMC Plant Biology*, v. 17, n. 1, p. 1–16, 2017b.
- BAI, S. *et al.* Transcriptome analysis of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) flower buds transitioning through endodormancy. *Plant and cell physiology*, v. 54, n. 7, p. 1132–1151, 2013.
- BARAKAT, A. *et al.* Large-scale identification of microRNAs from a basal eudicot (*Eschscholzia californica*) and conservation in flowering plants. *The Plant Journal*, v. 51, n. 6, p. 991–1003, 2007.
- BAUCHER, M. *et al.* A role for the miR396/GRF network in specification of organ type during flower development, as supported by ectopic expression of P *opulus* trichocarpa miR396c in transgenic tobacco. *Plant biology*, v. 15, n. 5, p. 892–898, 2013.
- BENÍTEZ, R. *et al.* Effects of dietary fat saturation on fatty acid composition and gene transcription in different tissues of Iberian pigs. *Meat science*, v. 102, p. 59–68, 2015.
- BLANKENSHIP, S. Ethylene effects and the benefits of 1-MCP. *Perishables Handling*

- Quarterly*, v. 108, p. 2–4, 2001.
- BLANKENSHIP, S. M.; DOLE, J. M. 1-Methylcyclopropene: A review. *Postharvest Biology and Technology*, v. 28, n. 1, p. 1–25, 2003.
- BUDAK, H.; AKPINAR, B. A. Plant miRNAs: biogenesis, organization and origins. 2015.
- BURNS, J. K. 1-Methylcyclopropene applications in preharvest systems: focus on citrus. *HortScience*, v. 43, n. 1, p. 112–114, 2008.
- CALVIÑO, M. *et al.* Characterization of the small RNA component of the transcriptome from grain and sweet sorghum stems. *BMC Genomics*, v. 12, n. 1, p. 356, 2011.
- CAMARGO, A. P. DE; CAMARGO, M. B. P. DE. Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. *Bragantia*, v. 60, n. 1, p. 65–68, 2001.
- CAMARGO, A. P. DE; FRANCO, C. F. Clima e fenologia do cafeeiro. *Cultura de café no Brasil*, p. 19–50, 1981.
- CARDON, G. *et al.* Molecular characterisation of the Arabidopsis SBP-box genes. *Gene*, v. 237, n. 1, p. 91–104, 1999.
- CHAE, H. S.; FAURE, F.; KIEBER, J. J. The *eto1*, *eto2*, and *eto3* mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in Arabidopsis by increasing the stability of ACS protein. *The Plant Cell*, v. 15, n. 2, p. 545–559, 2003.
- CHEN, L. *et al.* Ethylene-responsive miRNAs in roots of *Medicago truncatula* identified by high-throughput sequencing at whole genome level. *Plant science*, v. 184, p. 14–19, 2012.
- CHEN, L. *et al.* Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. *Planta*, v. 234, n. 2, p. 377, 2011.
- CHEN, XIAOBO *et al.* SQUAMOSA promoter-binding protein-like transcription factors: Star players for plant growth and development. *Journal of integrative plant biology*, v. 52, n. 11, p. 946–951, 2010.
- CHEN, XUEMEI. Small RNAs and Their Roles in Plant Development. 2009.
- CHEN, Y. F.; ETHERIDGE, N.; SCHALLER, G. E. Ethylene signal transduction. *Annals of Botany*, v. 95, n. 6, p. 901–915, 2005.
- CHENG, W.-C. *et al.* YM500: a small RNA sequencing (smRNA-seq) database for microRNA research. *Nucleic acids research*, v. 41, n. D1, p. D285–D294, 2012.
- CHENG, X.; RUYTER-SPIRA, C.; BOUWMEESTER, H. The interaction between strigolactones and other plant hormones in the regulation of plant development. *Frontiers in Plant Science*, v. 4, n. June, p. 1–16, 2013.
- CHUCK, G. *et al.* The maize tasselseed4 microRNA controls sex determination and meristem cell fate by targeting Tasselseed6/indeterminate spikelet1. *Nature genetics*, v. 39, n. 12, p. 1517, 2007.

- CHUINE, I.; BEAUBIEN, E. G. Phenology is a major determinant of tree species range. *Ecology Letters*, v. 4, n. 5, p. 500–510, 2001.
- CLOONAN, N. *et al.* MicroRNAs and their isomiRs function cooperatively to target common biological pathways. *Genome biology*, v. 12, n. 12, p. R126, 2011.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento - Acompanhamento da safra brasileira - V. 5 - SAFRA 2018 - N.4 - Quarto levantamento. p. 76, 2018.
- COOKE, J. E. K.; ERIKSSON, M. E.; JUNTILLA, O. The dynamic nature of bud dormancy in trees: environmental control and molecular mechanisms. *Plant, cell & environment*, v. 35, n. 10, p. 1707–1728, 2012.
- CRISOSTO, C. H.; GRANTZ, D. A.; MEINZER, E. C. Effects of water deficit on flower opening in coffee (*Coffea arabica* L.). *Tree Physiology*, v. 10, n. 2, p. 127–139, 1992.
- CURABA, J.; SINGH, M. B.; BHALLA, P. L. MiRNAs in the crosstalk between phytohormone signalling pathways. *Journal of Experimental Botany*, v. 65, n. 6, p. 1425–1438, 2014.
- DAVIS, A. P. *et al.* Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 167, n. 4, p. 357–377, 2011.
- DAVIS, A. P. *et al.* The Impact of Climate Change on Indigenous Arabica Coffee (*Coffea arabica*): Predicting Future Trends and Identifying Priorities. *PLoS ONE*, v. 7, n. 11, p. 10–14, 2012.
- DE OLIVEIRA, R. R. *et al.* Flower development in *Coffea arabica* L.: New insights into MADS-box genes. *Plant Reproduction*, v. 27, n. 2, p. 79–94, 2014.
- DEBERNARDI, J. M. *et al.* Functional specialization of the plant miR396 regulatory network through distinct microRNA–target interactions. *PLoS Genetics*, v. 8, n. 1, p. e1002419, 2012.
- DING, Q.; ZENG, J.; HE, X.-Q. Deep sequencing on a genome-wide scale reveals diverse stage-specific microRNAs in cambium during dormancy-release induced by chilling in poplar. *BMC plant biology*, v. 14, n. 1, p. 267, 2014.
- DOMBROWSKI, J. E.; MARTIN, R. C. Abiotic stresses activate a MAPkinase in the model grass species *Lolium temulentum*. *Journal of plant physiology*, v. 169, n. 9, p. 915–919, 2012.
- FERNANDES-BRUM, C. N. *et al.* A genome-wide analysis of the RNA-guided silencing pathway in coffee reveals insights into its regulatory mechanisms. *PLoS ONE*, v. 12, n. 4, p. 1–30, 2017.
- FERNANDES-BRUM, C. N. RNA-GUIDED SILENCING PATHWAYS IN *Coffea* spp . : GENOME-TRANSCRIPTOME-WIDE ANALYSES LAVRAS – MG. p. 1–162, 2017.
- GIACOMELLI, J. I. *et al.* Role of recently evolved miRNA regulation of sunflower HaWRKY6 in response to temperature damage. *New Phytologist*, v. 195, n. 4, p. 766–773, 2012.

- GONZÁLEZ-CALVO, L. *et al.* Effect of finishing period length with α -tocopherol supplementation on the expression of vitamin E-related genes in the muscle and subcutaneous fat of light lambs. *Gene*, v. 552, n. 2, p. 225–233, 2014.
- GOUVEIA, N. M. Estudo da diferenciação e crescimento de gemas florais de coffea arabica L. observações sobre antese e maturação dos frutos. 1984.
- GRANT-DOWNTON, R. *et al.* MicroRNA and tasiRNA diversity in mature pollen of Arabidopsis thaliana. *BMC genomics*, v. 10, n. 1, p. 643, 2009.
- GRIFFITHS-JONES, S. *et al.* miRBase : tools for microRNA genomics. v. 36, n. November 2007, p. 154–158, 2008.
- GRIFFITHS-JONES, S. *et al.* MicroRNA evolution by arm switching. *EMBO reports*, v. 12, n. 2, p. 172–177, 2011.
- GUERRA, A. F. *et al.* Irrigação do Cafeeiro no Cerrado: estratégia de manejo de água para uniformização de florada. . [S.l: s.n.], 2005.
- GUERREIRO-FILHO, O. *et al.* Origem e classificação botânica do cafeeiro. *Cultivares de café: origem, características e recomendações*. Brasília: Embrapa Café, p. 27–33, 2008.
- GUO, H. *et al.* Regulation of flowering time by Arabidopsis photoreceptors. *Science*, v. 279, n. 5355, p. 1360–1363, 1998.
- GUO, L. *et al.* Selected isomiR expression profiles via arm switching? *Gene*, v. 533, n. 1, p. 149–155, 2014.
- HARTMANN, U. *et al.* Molecular cloning of SVP: a negative regulator of the floral transition in Arabidopsis. *The Plant Journal*, v. 21, n. 4, p. 351–360, 2000.
- HE, J. Developmental Functions Of Mir156 And Mir157 In Arabidopsis. 2017a.
- HE, J. Developmental Functions Of Mir156 And Mir157 In Arabidopsis Developmental Functions Of Mir156 And Mir157 In Arabidopsis. 2017b.
- HÉMATY, K.; HÖFTE, H. Novel receptor kinases involved in growth regulation. *Current opinion in plant biology*, v. 11, n. 3, p. 321–328, 2008.
- IRISH, V. F. The flowering of Arabidopsis flower development. *The Plant Journal*, v. 61, n. 6, p. 1014–1028, 2010.
- JAIN, M. *et al.* Calcium dependent protein kinase (CDPK) expression during fruit development in cultivated peanut (Arachis hypogaea) under Ca²⁺-sufficient and-deficient growth regimens. *Journal of plant physiology*, v. 168, n. 18, p. 2272–2277, 2011.
- JAISWAL, V. S.; KUMAR, A.; LAL, M. Role of endogenous phytohormones and some macromolecules in regulation of sex differentiation in flowering plants. *Proceedings: Plant Sciences*, v. 95, n. 6, p. 453–459, 1985.
- JONES-RHOADES, M. W.; BARTEL, D. P. Jones-rhoades, M. W., & Bartel, D. P. (2004). Computational Identification of Plant MicroRNAs and Their Targets , Including a Stress-Induced miRNA, 14, 787–799. Computational Identification of Plant MicroRNAs and Their Targets , Including a Stress-Induced . v. 14, p. 787–799, 2004.

- KÄLLMAN, T. *et al.* A Significant Fraction of 21-Nucleotide Small RNA Originates from Phased Degradation of Resistance Genes in Several Perennial Species 1 [C] [W] [OA]. v. 162, n. June, p. 741–754, 2013.
- KAWASHIMA, CINTIA G. *et al.* Interplay of SLIM1 and miR395 in the regulation of sulfate assimilation in Arabidopsis. *Plant Journal*, v. 66, n. 5, p. 863–876, 2011.
- KAWASHIMA, CINTIA GOULART *et al.* Sulphur starvation induces the expression of microRNA-395 and one of its target genes but in different cell types. *The Plant Journal*, v. 57, n. 2, p. 313–321, 2009.
- KERBAUY, G. B. *Fisiologia vegetal*. [S.l.]: Guanabara Koogan Rio de Janeiro, 2004. v. 7.
- KHVOROVA, A.; REYNOLDS, A.; JAYASENA, S. D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, v. 115, n. 2, p. 209–216, 2003.
- LEE, J. *et al.* SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates LEAFY. *The Plant Journal*, v. 55, n. 5, p. 832–843, 2008.
- LEE, J. H. *et al.* Role of SVP in the control of flowering time by ambient temperature in Arabidopsis. *Genes & development*, v. 21, n. 4, p. 397–402, 2007.
- LI, D. *et al.* A repressor complex governs the integration of flowering signals in Arabidopsis. *Developmental cell*, v. 15, n. 1, p. 110–120, 2008.
- LI, S. The Arabidopsis thaliana TCP transcription factors: a broadening horizon beyond development. *Plant signaling & behavior*, v. 10, n. 7, p. e1044192, 2015.
- LIMA, A. A. Ethylene regulation under different watering conditions and its possible involvement in coffee (*Coffea arabica* L.) flowering: Ethylene is involved in coffee flowering regulation. 2015.
- LIU, C.; THONG, Z.; YU, H. Coming into bloom: the specification of floral meristems. *Development*, v. 136, n. 20, p. 3379–3391, 2009.
- LIU, H.-H. *et al.* Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in Arabidopsis thaliana. *Rna*, v. 14, n. 5, p. 836–843, 2008.
- LIU, H. *et al.* Identification of miRNAs and their target genes in developing maize ears by combined small RNA and degradome sequencing. 2014.
- LIU, N. *et al.* MicroRNA 157-targeted SPL genes regulate floral organ size and ovule production in cotton. *BMC Plant Biology*, v. 17, n. 1, p. 1–14, 2017.
- LIU, Q. *et al.* Expression analysis of phytohormone-regulated microRNAs in rice, implying their regulation roles in plant hormone signaling. *FEBS Letters*, v. 583, n. 4, p. 723–728, 2009a.
- LIU, Q. *et al.* Expression analysis of phytohormone-regulated microRNAs in rice, implying their regulation roles in plant hormone signaling. *FEBS letters*, v. 583, n. 4, p. 723–728, 2009b.
- LOHMANN, J. U.; WEIGEL, D. Building beauty: the genetic control of floral patterning. *Developmental cell*, v. 2, n. 2, p. 135–142, 2002.
- MAJEROWICZ, N.; SONDAHL, 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.

MALLORY, A. C.; BARTEL, D. P.; BARTEL, B. MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* AUXIN RESPONSE FACTOR17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *The Plant Cell*, v. 17, n. 5, p. 1360–1375, 2005.

MARCO, A. *et al.* Functional shifts in insect microRNA evolution. *Genome biology and evolution*, v. 2, p. 686–696, 2010.

MATTHEWMAN, C. A. *et al.* MiR395 is a general component of the sulfate assimilation regulatory network in *Arabidopsis*. *FEBS Letters*, v. 586, n. 19, p. 3242–3248, 2012.

MAZZITELLI, L. *et al.* Co-ordinated gene expression during phases of dormancy release in raspberry (*Rubus idaeus* L.) buds. *Journal of experimental botany*, v. 58, n. 5, p. 1035–1045, 2007.

MERCHAN, F. *et al.* Plant polycistronic precursors containing non-homologous microRNAs target transcripts encoding functionally related proteins. v. 10, n. 12, 2009.

METZGER, J. D. Hormones and reproductive development. *Plant hormones*. [S.l.]: Springer, 1995. p. 617–648.

MICHAELS, S. D. *et al.* AGL24 acts as a promoter of flowering in *Arabidopsis* and is positively regulated by vernalization. *The Plant Journal*, v. 33, n. 5, p. 867–874, 2003.

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*, v. 67, n. 1, 2008.

NAIR, S. K. *et al.* Cleistogamous flowering in barley arises from the suppression of microRNA-guided HvAP2 mRNA cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 1, p. 490–495, 2010.

NIBAU, C.; CHEUNG, A. New insights into the functional roles of CrRLKs in the control of plant cell growth and development. *Plant signaling & behavior*, v. 6, n. 5, p. 655–659, 2011.

NIU, Q. *et al.* Dormancy-associated MADS-box genes and microRNAs jointly control dormancy transition in pear (*Pyrus pyrifolia* white pear group) flower bud. *Journal of experimental botany*, v. 67, n. 1, p. 239–257, 2015.

Ó'MAOILÉIDIGH, D. S.; GRACIET, E.; WELLMER, F. Gene networks controlling *Arabidopsis thaliana* flower development. *New Phytologist*, v. 201, n. 1, p. 16–30, 2014.

OMIDBAKHSHFARD, M. A. *et al.* Growth-regulating factors (GRFs): a small transcription factor family with important functions in plant biology. *Molecular plant*, v. 8, n. 7, p. 998–1010, 2015.

PARK, M. Y. *et al.* Nuclear processing and export of microRNAs in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 102, n. 10, p. 3691–3696, 2005.

- PEI, H. *et al.* Integrative Analysis of miRNA and mRNA Profiles in Response to Ethylene in Rose Petals during Flower Opening. *PLoS ONE*, v. 8, n. 5, 2013.
- POSÉ, D.; YANT, L.; SCHMID, M. The end of innocence: flowering networks explode in complexity. *Current opinion in plant biology*, v. 15, n. 1, p. 45–50, 2012.
- PRESTON, J. C.; HILEMAN, L. C. Functional Evolution in the Plant SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Gene Family. *Frontiers in Plant Science*, v. 4, n. April, p. 1–13, 2013.
- RAMACHANDRAN, V.; CHEN, X. Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. *Science*, v. 321, n. 5895, p. 1490–1492, 2008.
- REINHART, B. J. *et al.* MicroRNAs in plants. *Genes & development*, v. 16, n. 13, p. 1616–1626, 2002.
- REN, G.; CHEN, X.; YU, B. Report Uridylation of miRNAs by HEN1 SUPPRESSOR1 in Arabidopsis. *Current Biology*, v. 22, n. 8, p. 695–700, 2012.
- RENA, A. B. *et al.* *Cultura do cafeeiro. Fatores que afetam a produtividade.* . [S.l.]: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato Piracicaba, 1986.
- RENA, A. B.; BARROS, R. S. Aspectos críticos no estudo da floração do café. *Efeitos da irrigação sobre a qualidade e produtividade do café. Viçosa: Ed. da UFV*, p. 149–172, 2004.
- RHOADES, M. W. *et al.* Prediction of plant microRNA targets. *cell*, v. 110, n. 4, p. 513–520, 2002.
- RODRIGUEZ, R. E. *et al.* Control of cell proliferation in Arabidopsis thaliana by microRNA miR396. *Development*, v. 137, n. 1, p. 103–112, 2010.
- ROGERS, K.; CHEN, X. Biogenesis , Turnover , and Mode of Action of. v. 25, n. July, p. 2383–2399, 2013.
- ROHDE, A.; BHALERAO, R. P. Plant dormancy in the perennial context. *Trends in plant science*, v. 12, n. 5, p. 217–223, 2007.
- RONCHI, C. P. *et al.* Respostas ecofisiológicas de cafeeiros submetidos ao deficit hídrico para concentração da florada no Cerrado de Minas Gerais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 50, n. 1, p. 24–32, 2015.
- RUBIO-SOMOZA, I.; WEIGEL, D. Coordination of flower maturation by a regulatory circuit of three microRNAs. *PLoS genetics*, v. 9, n. 3, p. e1003374, 2013.
- SANTNER, A.; CALDERON-VILLALOBOS, L. I. A.; ESTELLE, M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature chemical biology*, v. 5, n. 5, p. 301, 2009.
- SANTOS, I. S. Influência do etileno na regulação do florescimento de Coffea arabica L. 2016.
- SHIKATA, M. *et al.* Arabidopsis SBP-box genes SPL10, SPL11 and SPL2 control morphological change in association with shoot maturation in the reproductive phase. *Plant and cell physiology*, v. 50, n. 12, p. 2133–2145, 2009.
- SILVA, G. F. F. E *et al.* micro RNA 156-targeted SPL/SBP box transcription factors

- regulate tomato ovary and fruit development. *The Plant Journal*, v. 78, n. 4, p. 604–618, 2014.
- SISLER, E. C.; SEREK, M. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. *Physiologia Plantarum*, v. 100, n. 3, p. 577–582, 1997.
- SRIKANTH, A.; SCHMID, M. Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cellular and molecular life sciences*, v. 68, n. 12, p. 2013–2037, 2011.
- STEIBEL, J. P. *et al.* A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. *Genomics*, v. 94, n. 2, p. 146–152, 2009.
- SU, C. L. *et al.* A modified ABCDE model of flowering in orchids based on gene expression profiling studies of the moth orchid *Phalaenopsis aphrodite*. *PLoS ONE*, v. 8, n. 11, p. 1–14, 2013.
- SUN, R. *et al.* Role of microRNAs During Flower and Storage Root Development in Sweet Potato. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 33, n. 6, p. 1731–1739, 2015.
- 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, n. 1–2, p. 161–167, 2008.
- TRUSOV, Y.; BOTELLA, J. R. Silencing of the ACC synthase gene ACACS2 causes delayed flowering in pineapple [*Ananas comosus* (L.) Merr.]. *Journal of Experimental Botany*, v. 57, n. 14, p. 3953–3960, 2006.
- VAN DER VOSSSEN, H.; BERTRAND, B.; CHARRIER, A. Next generation variety development for sustainable production of arabica coffee (*Coffea arabica* L.): a review. *Euphytica*, v. 204, n. 2, p. 243–256, 2015.
- VANSTRAELEN, M.; BENKOVÁ, E. Hormonal interactions in the regulation of plant development. *Annual review of cell and developmental biology*, v. 28, p. 463–487, 2012.
- VOINNET, O. Review Origin , Biogenesis , and Activity of Plant MicroRNAs. *Cell*, v. 136, n. 4, p. 669–687, 2009.
- WANG, J.-W. *et al.* miRNA control of vegetative phase change in trees. *PLoS Genetics*, v. 7, n. 2, p. e1002012, 2011.
- WANG, J. W.; CZECH, B.; WEIGEL, D. miR156-Regulated SPL Transcription Factors Define an Endogenous Flowering Pathway in Arabidopsis thaliana. *Cell*, v. 138, n. 4, p. 738–749, 2009.
- WANG, K. L.-C.; LI, H.; ECKER, J. R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *The plant cell*, v. 14, n. suppl 1, p. S131–S151, 2002.
- WANG, L. *et al.* miR396-targeted AtGRF transcription factors are required for coordination of cell division and differentiation during leaf development in Arabidopsis. *Journal of experimental Botany*, v. 62, n. 2, p. 761–773, 2010.
- WANG, T. *et al.* Identification and profiling of novel and conserved microRNAs during the flower opening process in *Prunus mume* via deep sequencing. *Molecular Genetics and Genomics*, v. 289, n. 2, p. 169–183, 2014.

- WANG, H. V; CHEKANOVA, J. A. Small RNAs : essential regulators of gene expression and defenses against environmental stresses in plants. v. 7, n. June, 2016.
- WANG, YI *et al.* Function annotation of an SBP-box gene in Arabidopsis based on analysis of co-expression networks and promoters. *International journal of molecular sciences*, v. 10, n. 1, p. 116–132, 2009.
- WANG, YUNXIANG *et al.* Parsing the Regulatory Network between Small RNAs and Target Genes in Ethylene Pathway in Tomato. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, n. April, p. 1–13, 2017.
- WANG, Z. J. *et al.* Discovery and profiling of novel and conserved microRNAs during flower development in *Carya cathayensis* via deep sequencing. *Planta*, v. 236, n. 2, p. 613–621, 2012.
- WINTGENS, J. N. *Coffee: growing, processing, sustainable production. A guidebook for growers, processors, traders and researchers.* [S.l.]: Wiley-Vch, 2009.
- XU, M. *et al.* Developmental Functions of miR156-Regulated SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Genes in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genetics*, v. 12, n. 8, p. 1–29, 2016.
- YAMAGUCHI, A.; ABE, M. Regulation of reproductive development by non-coding RNA in Arabidopsis: to flower or not to flower. *Journal of plant research*, v. 125, n. 6, p. 693–704, 2012.
- YAMANE, H. *et al.* Expressional regulation of PpDAM5 and PpDAM6, peach (*Prunus persica*) dormancy-associated MADS-box genes, by low temperature and dormancy-breaking reagent treatment. *Journal of experimental botany*, v. 62, n. 10, p. 3481–3488, 2011.
- YANG, C.-Y. *et al.* MiR396-targeted SHORT VEGETATIVE PHASE is required to repress flowering and is related to the development of abnormal flower symptoms by the PHYL1 effector. *Plant physiology*, p. pp-00307, 2015.
- YANG, F.; YU, D. Overexpression of Arabidopsis MiR396 enhances drought tolerance in transgenic tobacco plants. *Acta Botanica Yunnanica*, v. 31, n. 5, p. 421–426, 2009.
- YANG, X.; DENG, F.; RAMONELL, K. M. Receptor-like kinases and receptor-like proteins: keys to pathogen recognition and defense signaling in plant innate immunity. *Frontiers in Biology*, v. 7, n. 2, p. 155–166, 2012.
- YANG, Z. *et al.* Comparative study of SBP-box gene family in Arabidopsis and rice. v. 407, p. 1–11, 2008.
- YU, N. *et al.* Temporal Control of Trichome Distribution by MicroRNA156-Targeted SPL Genes in Arabidopsis thaliana. v. 22, n. July, p. 2322–2335, 2010.
- YUAN, N. *et al.* Heterologous expression of a rice miR395 gene in *Nicotiana tabacum* impairs sulfate homeostasis. *Scientific reports*, v. 6, p. 28791, 2016.
- ZENG, S. *et al.* Identification and validation of reference genes for quantitative real-time PCR normalization and its applications in lycium. *PloS one*, v. 9, n. 5, p. e97039, 2014.
- ZHANG, X. *et al.* Over-expression of sly-miR156a in tomato results in multiple vegetative and reproductive trait alterations and partial phenocopy of the sft mutant.

FEBS Letters, v. 585, n. 2, p. 435–439, 2011.

ZHAO, Y. *et al.* NONCODE 2016 : an informative and valuable data source of long non-coding RNAs. v. 44, n. November 2015, p. 203–208, 2016.

ZHOU, L. *et al.* Genome-wide identification and analysis of drought-responsive microRNAs in *Oryza sativa*. *Journal of experimental botany*, v. 61, n. 15, p. 4157–4168, 2010.

ZHU, Q.; HELLIWELL, C. A. Regulation of flowering time and floral patterning by miR172. v. 62, n. 2, p. 487–495, 2011.

ZHU, Z. *et al.* Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 30, p. 12539–12544, 2011.

ZUO, J. *et al.* Sculpting the maturation, softening and ethylene pathway: The influences of microRNAs on tomato fruits. *BMC Genomics*, v. 13, n. 1, 2012.