



IASMINY SILVA SANTOS

**ETILENO E O FLORESCIMENTO DE *COFFEA ARABICA*:
IDENTIFICAÇÃO *IN SILICO* E ANÁLISE DA EXPRESSÃO
GÊNICA DA VIA DE BIOSÍNTESE E SINALIZAÇÃO EM
RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO, REIDRATAÇÃO E
AÇÃO DO 1-METILCICLOPROPENO**

LAVRAS - MG

2020

IASMINY SILVA SANTOS

**ETILENO E O FLORESCIMENTO DE *COFFEA ARABICA*:
IDENTIFICAÇÃO *IN SILICO* E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA VIA DE
BIOSSÍNTESE E SINALIZAÇÃO EM RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO, REIDRATAÇÃO
E AÇÃO DO 1-METILCICLOPROPENO**

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

Prof. Dr. Antonio Chalfun Júnior (UFLA)

Orientador

Dr. André Almeida Lima (UFLA)

Coorientador

LAVRAS – MG

2020

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

Santos, Iasminy Silva.

Etileno e o florescimento de *Coffea arabica*: identificação *in silico* e análise da expressão gênica da via de biossíntese e sinalização em resposta ao déficit hídrico, reidratação e ação do 1-Metilciclopropeno / Iasminy Silva Santos. - 2020.

184 p. : il.

Orientador(a): Antonio Chalfun Júnior.

Coorientador(a): André Almeida Lima.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Cafeeiro. 2. Antese. 3. 1-MCP. I. Júnior, Antonio Chalfun.
II. Lima, André Almeida. III. Título.

IASMINY SILVA SANTOS

ETILENO E O FLORESCIMENTO DE *COFFEA ARABICA*: IDENTIFICAÇÃO *IN SILICO* E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA VIA DE BIOSÍNTESE E SINALIZAÇÃO EM RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO, REIDRATAÇÃO E AÇÃO DO 1-METILCICLOPROPENO

ETHYLENE AND THE FLOWERING OF *COFFEA ARABICA*: *IN SILICO* IDENTIFICATION AND ANALYSIS OF GENE EXPRESSION OF THE BIOSYNTHESIS PATHWAY AND SIGNALING IN RESPONSE TO WATER DEFICIT, REHYDRATION AND ACTION OF 1-METHYLCYCLOPROPENE

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

APROVADA em 28 de fevereiro de 2020

Dr. Antonio Chalfun Júnior – UFLA
Dr^a. Carla Maria Alexandre Pinheiro – FCT-NOVA
Dr. Carlos Henrique Siqueira de Carvalho – EMBRAPA
Dr. Paulo Eduardo Ribeiro Marchiori – UFLA
Dr^a. Vânia Aparecida Silva - EPAMIG

Antonio Chalfun Júnior, PhD

Orientador

Dr. André Almeida Lima (UFLA)

Coorientador

LAVRAS – MG

2020

*Á vô Ataíde,
com quem sonhei em partilhar esse momento, mas partiu sem se despedir.*

Dedico.

“Precisamos encorajar mais mulheres a se atreverem a mudar o mundo”

Chimamanda Adichie

AGRADECIMENTOS

A Deus, cuja providência foi presente em cada detalhe.

Aos meus pais, José Carlos e Rita de Cássia, por incentivar incansavelmente meu crescimento profissional, sendo meu abrigo e fonte inesgotável de amor.

Welber e Karine, meus irmãos de vida, pelo afeto e por partilhar comigo a alegria das minhas conquistas.

Á meus avós Ataíde (*in memoria*), Carlita e Laurita, pelo zelo e orações. Aos meus padrinhos, tios e primos que recarregavam minhas energias á cada reencontro.

Á família Assis, pelo acolhimento e generosidade.

Aos amigos Kauanne, Jacqueline, Rafael, Bárbara, Beatriz e Gabriel por serem um ponto de apoio durante essa caminhada. Poderia falar tanta coisa, mas só sei sentir gratidão!

Á Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de iniciar os estudos na Pós-Graduação e estrutura oferecida para minha formação. Ao programa de pós-graduação em Fisiologia Vegetal e aos professores por todo ensinamento compartilhado. Aos funcionários do setor, Salete, Joel e Odorêncio, por serem tão solícitos.

Ao professor e orientador, Antonio Chalfun, pela confiança depositada e liberdade concedida para a execução desse trabalho.

Aos membros e ex-membros do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas, pela ajuda e contribuição nos experimentos, em especial, a Kauanne, Rafael, Thales, Marlon e André, pelas discussões e contribuições para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Professor Renato Ribeiro e a Doutora Jacqueline Oliveira pelo grande auxílio nas análises estatísticas.

Aos membros da banca examinadora, pela gentileza em aceitar contribuir com esse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado e a FAPEMIG pelo apoio financeiro no projeto APQ-03406-18.

RESUMO

O cenário da cafeicultura mundial destaca o Brasil como o maior produtor e exportador de café beneficiado, e com base no volume de exportação previsto para o ano de 2020, o país mostra uma tendência de predomínio nesse setor. Um dos pontos relevantes da cultura é a qualidade da bebida, e um fator que apresenta forte influência sobre a classificação da xícara é o estágio de maturação dos frutos no momento da colheita. O grau de maturação dos frutos está relacionado com os eventos de florada que, no cafeeiro, pode ocorrer mais de uma vez no decorrer de um mesmo ciclo produtivo. Esse florescimento sequencial resulta do desenvolvimento assíncrono das gemas e é uma característica intrínseca da espécie, acarretando na maturação desuniforme dos frutos. Períodos secos acompanhados por chuva ou irrigação para sincronizar o florescimento do cafeeiro é relatado há algum tempo, mas a influência desses eventos nos processos internos que estão envolvidos na indução e abertura floral de *Coffea arabica* ainda não estão totalmente esclarecidos. Sabe-se que durante o déficit hídrico alterações em nível celular, molecular e de sistema ocorrem para coordenar respostas rápidas em condições desfavoráveis. Os hormônios integram o grupo de moléculas capazes de responder rapidamente a tensões bióticas e abióticas, e o etileno integra o grupo de hormônios responsivos ao déficit hídrico. Portanto, a influência do etileno no florescimento do cafeeiro foi sugerida baseado nas exigências para o desenvolvimento das gemas florais nessa espécie. Nesse sentido, a observação de antese promovida por um inibidor de ação do etileno foi inesperada. O 1-Metilciclopropeno (1-MCP) é amplamente comercializado como um potente antagonista da ação do etileno, mas regulou positivamente os genes das enzimas de biossíntese (ACS e ACO) e sinalização (ETR4) desse hormônio em *Coffea arabica*. Foi argumentado que o aumento na biossíntese do etileno pode ter elevado os níveis do hormônio e isso teria regulado o tempo de abertura das flores de café. No entanto, não existem informações consistentes sobre as modificações ocorridas no metabolismo do etileno desencadeada por diferentes condições hídricas e pelo 1-MCP. Visando ampliar o conhecimento sobre a influência do etileno no florescimento de *Coffea arabica*, esse estudo analisou *in silico* possíveis ortólogos da ACS e ACO, e analisou a expressão gênica por RT-qPCR de onze genes relacionados com as vias de biossíntese e sinalização do etileno em cafeeiros submetidos a diferentes tratamentos hídricos e pulverizados com 1-MCP. O potencial hídrico foliar foi avaliado durante o período experimental, além da quantificação da produção de etileno em cada tratamento. *Coffea arabica* possui uma pequena família multigênica para as enzimas ACS e ACO. O nível de expressão desses genes homólogos é regulado pela condição hídrica e existe um padrão de expressão único e sobreposto em diferentes órgãos. O 1-MCP regula positivamente a via de biossíntese elevando a concentração de etileno em folhas de *Coffea arabica*, possivelmente por um mecanismo de retroalimentação pela perda do *feedback* negativo. Entretanto, o 1-MCP reprime a expressão do receptor *CaETR1-like*, possivelmente promovendo um fino ajuste na sensibilidade ao etileno.

Palavras-chave: Cafeeiro. Antese. 1-MCP.

ABSTRACT

Brazil is the largest producer and exporter of processed coffee in the world and based on the export volume forecast for 2020, those will continue. One of the most important points is the coffee crop is the quality of beverage for the final consumer, and one of the most important factor influencing on the classification of the quality cup is the fruit ripening stage at the time of harvest. The degree of ripeness of the fruits is related to the flowering events that, in the coffee tree, can occur many times during the same production cycle. This sequential flowering results from the asynchronous development of the flower buds and is an intrinsic characteristic of coffee species, resulting in the uneven maturation of fruits. Drought periods accompanied by rain or irrigation to synchronize the flowering time of coffee tree have been reported, but the influence of these events on the internal processes that are involved in the induction and floral opening of *Coffea arabica* are not yet fully understood. It is known that during the water deficit changes at the cellular, molecular level occur to coordinate responses in unfavorable conditions. Plant hormones are involved in the quickly response to biotic and abiotic stresses, and ethylene is one of the plant hormones responsive to water deficit. Therefore, the influence of ethylene on coffee flowering was suggested based on the requirements for the floral buds development in coffee. In this sense, the observation of promoted anthesis by an ethylene action inhibitor was unexpected. 1-Methylcyclopropene (1-MCP) is widely marketed as an ethylene action antagonist, but when used in coffee plants showed a positive regulation of genes in the ethylene biosynthesis enzymes (ACS and ACO) and signaling (ETR4) of this hormone in. It was argued that the increase in ethylene biosynthesis may have raised the hormone levels and this would have regulated the opening time of coffee flowers. However, there is not consistent information on the changes in ethylene metabolism triggered by different water conditions and by 1-MCP. Aiming to increase knowledge about the influence of ethylene on the flowering of *Coffea arabica*, this study analyzed in silico possible genes orthologs from ACS and ACO, and analyzed the gene expression by RT-qPCR of eleven genes related to the biosynthesis and signaling pathways of ethylene in coffee trees submitted to different water treatments and treated with 1-MCP. The leaf water potential was evaluated during the experimental period, in addition to the quantification of ethylene production in each treatment. *Coffea arabica* has a small multigene family for the enzymes ACS and ACO. The level of expression of these homologous genes is regulated by the water condition and there is a unique and overlapping expression pattern in different organs. 1-MCP positively regulates the biosynthesis pathway by increasing the ethylene concentration in *Coffea arabica* leaves, possibly through a feedback mechanism due to the loss of negative feedback. However, 1-MCP suppresses the expression of the *CaETR1-like* receptor, possibly promoting a fine adjustment in sensitivity to ethylene.

Keywords: Coffee tree. Anthesis. 1-MCP.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	Introdução Geral	11
1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Panorama econômico da cafeicultura no Brasil	13
2.2	Aspectos botânicos e morfológicos de <i>Coffea arabica</i>	15
2.3	Fenologia reprodutiva de <i>Coffea arabica</i>	16
2.4	Florescimento do cafeeiro: interação entre o status hídrico e a regulação da biossíntese de etileno	20
2.5	Etileno: da biossíntese à regulação de processos fisiológicos	22
2.6	Etileno na regulação do florescimento	27
2.7	1-Metilciclopropeno e a indução da antese no cafeeiro	28
2.8	Impacto da assincronia floral na economia cafeeira	32
2.9	Controle artificial do etileno para maturação uniforme dos frutos de café	33
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	36
	REFERÊNCIAS	37
CAPÍTULO 2	Identificação <i>in silico</i> e análise da expressão dos genes da biossíntese do etileno responsivos ao déficit hídrico em <i>Coffea arabica</i>	62
1	INTRODUÇÃO	65
2	MATERIAL E MÉTODOS	67
2.1	Identificação <i>in silico</i> das sequências homólogas e análises filogenéticas de <i>Coffea arabica</i>	67
2.2	Desenho de primers para RT- qPCR	68
2.3	Condição de crescimento das plantas, tratamentos e amostragem das plantas para RT- qPCR	69
2.4	Isolamento de RNA e síntese de cDNA	70
2.5	Análise da expressão gênica via RT- qPCR	71
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
3.1	Análise filogenética	72
3.2	Análise da expressão gênica	86
4	CONCLUSÕES	97
	REFERÊNCIAS	98
	APÊNDICE A	125
	APÊNDICE B	126
CAPÍTULO 3	Regulação da biossíntese de etileno em <i>Coffea arabica</i> durante o déficit hídrico, reirrigação e pulverização com 1-Metilciclopropeno	127
1	INTRODUÇÃO	130
2	MATERIAL E MÉTODOS	132
2.1	Condições de crescimento das plantas	132

2.2	Tratamentos e amostragem das plantas.....	133
2.3	Parâmetro fisiológico	134
2.4	Determinação da produção de etileno	135
2.5	Extração de RNA total e Síntese de cDNA	135
2.6	Análise de sequencias	136
2.7	Desenho de primers.....	137
2.8	Análise da expressão gênica via RT-qPCR	137
2.9	Análise Estatística	138
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	139
3.1	Análises Fisiológicas.....	139
3.2	Produção de etileno	140
4	CONCLUSÕES	153
	REFERÊNCIAS	154
	CAPÍTULO 4 Perspectivas futuras	179
1	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	180
2	CONSIDERAÇÕES FINAIS	183

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO GERAL

1. INTRODUÇÃO

O cenário da cafeicultura mundial destaca o Brasil como o maior produtor e exportador de café beneficiado, e com base no volume de exportação previsto para ano o de 2020 o país mostra uma tendência de predomínio nesse setor (OIC, 2020). A área total utilizada para esta cultura no Brasil compreende 2,23 milhões de hectares com destaque para o cultivo do café arábica (*Coffea arabica*), que corresponde a 79,9% da área existente com lavoura de café. Apesar dos efeitos fisiológicos da bienalidade negativa terem reduzido em 20% a produtividade no ano de 2019, 49,31 milhões de sacas beneficiadas (arábica e conilon) foram produzidas, sendo que Minas Gerais, o maior estado produtor do país, contribuiu com aproximadamente 50% desse volume. (CONAB, 2019).

Um dos pontos relevantes da cultura é a qualidade da bebida, e um fator que apresenta forte influência sobre a classificação da xícara é o estágio de maturação dos frutos no momento da colheita (FAGAN et al., 2011). O grau de maturação dos frutos está relacionado com os eventos de florada que, no cafeeiro, pode ocorrer mais de uma vez no decorrer de um mesmo ciclo produtivo. Esse florescimento sequencial resulta do desenvolvimento assincrônico das gemas, e é uma característica intrínseca da espécie, acarretando na maturação desuniforme dos frutos (NOGUEIRA et al., 2005). O tempo de floração é regulado por fatores exógenos como fotoperíodo e temperatura, bem como por fatores endógenos, como a idade da planta e a concentração dos hormônios (SRIKANTH & SCHMID, 2011; LI et al., 2016). Um importante aspecto a ser analisado em cafeeiros é a regulação dos fatores internos da planta a exemplo do balanço hormonal, pois informações sobre como essas substâncias atuam no desenvolvimento das gemas ainda são insipientes (NASCIMENTO, 2006). Pesquisas mais recentes tem buscado ampliar o conhecimento acerca dos eventos que ocorrem no desenvolvimento das gemas florais a nível anatômico e molecular (CARDON, 2016; DE OLIVEIRA et al., 2014), mas pouco se avançou em relação ao conhecimento das vias regulatórias para a abertura dos botões florais do café.

Embora a literatura enfatize a importância do período seco acompanhado por chuva ou irrigação para sincronizar o florescimento do cafeeiro (ALVIM, 1960; RENA & BARROS, 2004), a influência desses eventos nos processos internos que estão envolvidos na indução e abertura floral ainda não estão totalmente esclarecidos. Informações sobre o efeito destes eventos na regulação hormonal de *Coffea arabica*, por exemplo, são pouco conhecidas tornando-se necessário ampliar o entendimento desses mecanismos e sua relação com a regulação do florescimento nesta espécie. Recentemente Lima (2015) relatou a provável

influência do hormônio etileno no florescimento do cafeeiro. Seus resultados indicaram que a abertura floral observada após pulverização com 1-Metilciclopropeno (1-MCP) justificava-se pelas alterações nos níveis de transcritos das vias de biossíntese e sinalização do etileno. O 1-MCP é um potente antagonista da ação do etileno e historicamente é utilizado comercialmente para inibir os efeitos do etileno sobre culturas hortícolas e ornamentais, retardando principalmente processos de maturação e senescência (BLANKENSHIP & DOLE, 2003; M. SEREK & SISLER, 2001; TREVENZOLI FAVERO et al., 2016; WIN et al., 2019). Portanto, a antese promovida pelo 1-MCP foi um resultado inesperado e ainda que algumas hipóteses tenham sido sugeridas para explicar tal efeito (LIMA, 2015; SANTOS, 2016), não existem informações consistentes sobre as modificações ocorridas no metabolismo do etileno desencadeada pelo 1-MCP.

Ainda com relação ao florescimento, estudos importantes enfatizaram a necessidade de um período de seca nessa fase fenológica para o desenvolvimento das gemas florais (CRISOSTO et al., 1992; GUERRA et al., 2005). Como se sabe, o etileno integra o grupo de hormônios responsivos ao déficit hídrico e é possível que alterações ocorridas durante esse período e a interação com outros hormônios contribuam ou atuem como sinal para a floração do cafeeiro. Além disso, é importante ressaltar que o etileno parece estar relacionado com outro aspecto relevante de *Coffea arabica*, o processo de maturação dos frutos. Ságio et al. (2014) relataram que os frutos no estágio cereja, fisiologicamente maduros, exibiram picos na expressão de genes da biossíntese e sinalização do etileno em comparação com frutos verdes. Esses dados sugerem que o cafeeiro pode ser uma espécie climatérica. Em conjunto, essas informações demonstram que o etileno pode estar intimamente associado com diferentes aspectos da fisiologia reprodutiva do cafeeiro. Nesse sentido, estudos que contribuam para compreensão desses eventos e dos mecanismos regulatórios associados são indispensáveis para validar as hipóteses levantadas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Panorama econômico da cafeicultura no Brasil

A cafeicultura é um importante ramo do agronegócio mundial, visto que, o café é um dos mais valiosos produtos primários comercializados a nível global. Essa *commodity* é cultivada em mais 50 países com produção superior a 169 milhões de sacas de 60kg (arábica e conilon) beneficiadas em 2019 (OIC, 2019). Esses dados já configuram a dimensão comercial do setor cafeeiro, mas além da importância monetária associada à comercialização do café, essa cultura contempla um importante papel social. Estima-se que mais de 25 milhões de pessoas na

América Latina, África e Ásia executam atividades ao longo da cadeia produtiva do café. O setor cafeeiro exerce papel significativo na geração e distribuição de renda e, embora algumas regiões produtoras possuam alto nível tecnológico para o desenvolvimento das práticas de manejo, do plantio à pós-colheita, o sistema de produção com base na mão-de-obra intensiva ainda é predominante, inclusive no principal país produtor (CHALFOUN; REIS, 2010; LASHERMES et al., 2008)

No Brasil, os cafezais descendem exclusivamente da cultivar Arábica (*Coffea arabica*). Essa muda foi a primeira planta de café introduzida no país, precisamente em Belém no ano de 1727, e foi difundida rapidamente para outras regiões onde mostrou-se bem adaptada, apesar das variações edafoclimáticas (CHALFOUN; REIS, 2010; GUERREIRO-FILHO et al., 2008; SOUZA; LORENZI, 2005). Somente a partir do século 19 o cultivo de café atingiu maiores proporções com o intuito de suprir a demanda do mercado interno. Dante disso, a cafeicultura tornou-se durante muitos anos o principal setor da economia brasileira e atualmente é um dos principais produtos de exportação (ALCANTARA, 2012). O país permanece no topo do *ranking* como maior produtor e exportador mundial de café, além de possuir o segundo mercado consumidor. A área destinada ao cultivo dos cafés arábica (*Coffea arabica*) e conilon (*Coffea canephora*) no Brasil ocupa 2,13 milhões de hectares, onde 85% está em processo produtivo gerando 49,31 milhões de sacas beneficiadas (arábica e conilon) na última safra. Apesar da influência exercida pelos efeitos fisiológicos da bienalidade negativa, no ano de 2019, o volume de exportação foi 14,8% maior, alcançando a marca histórica de 40,6 milhões de sacas exportadas para 128 países, considerando café verde, solúvel, torrado e moído. Isso consolida o Brasil como maior exportador global, suprimindo em 36% a demanda do mercado internacional, seguido pelo Vietnã que contribui com 18,31%. Isso demonstra que no contexto de consumo global do café, os mercados externos continuam receptivos ao produto brasileiro, especialmente pela qualidade dos grãos. Os principais destinos de embarque dos cafés produzidos no Brasil são: Estados Unidos (19,4%), Alemanha (16,7%) e Itália (8,8%) (CECAFÉ, 2019).

A região sudeste do Brasil concentra o maior volume de produção (86,4%) com foco nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo. As regiões norte-nordeste, centro-oeste e sul do país também contribuem para a expansão do mercado cafeeiro, embora com parcela menos significativa. O destaque de cultivo nacional permanece para o café arábica que ocupa 81% da área destinada a cafeicultura. Dentre os estados da Federação, Minas Gerais concentra o cultivo dessa espécie que corresponde a 70% das lavouras de café arábica no âmbito nacional (CONAB, 2019), e possui estimativa de aumento em 2,1% para próxima safra (CONAB, 2020). Esse cultivo majoritário confere a Minas Gerais o predomínio sob a produção

brasileira e tem como principais regiões produtoras o sul e centro-oeste do estado. A safra mineira de 2019 gerou 24,55 das 49,31 milhões de sacas beneficiadas no país. É importante ressaltar que 2019 foi um ano de bienalidade negativa, além disso, a estiagem ocorrida entre dezembro de 2018 e janeiro de 2019 comprometeu a formação e granação dos frutos, reduzindo 20% da produção em comparação ao ano anterior (CONAB, 2019).

Embora o ciclo bienal seja uma característica intrínseca dos cafeeiros, o esgotamento da planta em ano de alta produção é mais pronunciado em *Coffea arabica*, já que as características fisiológicas e maior robustez de *Coffea canephora* minimizam os efeitos oriundos da bienalidade. Em suma, a suscetibilidade de *Coffea arabica* a oscilação na intensidade da floração impacta diretamente a produtividade brasileira devido ao predomínio do cultivo dessa espécie. Assim, a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2020) estima para a próxima safra o incremento de 25,8% na produção em relação a colheita anterior, gerando entre 57,15 e 62,02 milhões de sacas beneficiadas de café (arábica e conilon). A perspectiva de crescimento para os próximos anos reforça a importância do café para a balança comercial do agronegócio brasileiro, que ocupa a 5ª posição na pauta de exportação (MAPA, 2020) e registrou a receita cambial de US\$ 5,1 bilhões (EMBRAPA CAFÉ, 2019).

2.2 Aspectos botânicos e morfológicos de *Coffea arabica*

Os cafeeiros, árvores ou arbustos tropicais, são plantas nativas do continente africano, localizados entre os sub-bosques das florestas da Etiópia e a região sul do Sudão. Essa distribuição submeteu essas plantas a variações de altitude e temperatura que oscilam entre 1.600 a 2000 metros e 17 a 26°C, respectivamente (CAMARGO; PEREIRA, 1994; LIVRAMENTO, 2010). Pertencem à família Rubiaceae e ao subgênero *Coffea*, que abrange mais de uma centena de espécies. Destas, 7 merecem destaque pois são cultivadas em seus locais de origem ou utilizadas como fonte para o melhoramento genético: *Coffea bengalensis* Heyne ex Willd; *Coffea eugenoides* S. Moore; *Coffea stenophylla* G. Don; *Coffea racemosa* Lour; *Coffea congensis* Froenh; *Coffea zanguebariae* Lour, *Coffea abeokutoe* (CHARRIER, 1978; FAZUOLI, 1986; SAKIYAMA et al., 1999). Quanto ao aspecto econômico, apenas 4 têm significativa importância: *C. arabica* (café arábica), *C. canephora* (café conilon/robusta), *C. liberica* (café libérica), e *C. dewevrei* (café excelsa) (DAVIS et al., 2006; GUERREIRO-FILHO et al., 2008). Contudo, no mercado mundial, somente duas são exploradas comercialmente, de modo que, lavouras cafeeiras destinadas à produção em escala comercial são compostas apenas por *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, que representam aproximadamente 70% e 30% da produção global, respectivamente (OIC, 2019).

As plantas de *Coffea arabica* são arbustos monocaule que podem atingir até 10 metros, mas não costumam ultrapassar os 6 metros nas lavouras, devido ao manejo da cultura. Sua copa desenvolve-se sobre um único ramo vertical, ortotrópico, apresentando arquitetura cilíndrica (ALVES, 2008; EMBRAPA, 2001). As folhas são ovaladas ou sub lanceoladas com bordas onduladas, coloração verde-escura e epiderme superior com aspecto brilhante, distribuídas nos vários ramos plagiotrópicos, em posição oposta. Nessa espécie, a inflorescência denomina-se glomérulo e possui de 2-19 flores de coloração branca, composta por 5 pétalas soldadas entre si, formando a corola. A partir de cada pétala desenvolve-se curtos estames com as anteras na sua extremidade. Já o pistilo, é um longo tubo projetado a partir do ovário inferior que culmina em um estigma bífido acima da corola (COSTE, 1955). Essas flores são hermafroditas, e por isso, cerca de 90% delas são fertilizadas por autofecundação. Portanto, plantas de *Coffea arabica* possuem reprodução autógama. Além disso, é a única espécie tetraploide ($4n = 44$ cromossomos) descrita para o gênero *Coffea* (CARVALHO; MÔNACO, 1964; CHALFOUN; REIS, 2010; LASHERMES et al., 1999; SAKIYAMA et al., 1999). O fruto é uma drupa ovoide bilocular com exocarpo vermelho ou amarelo quando maduro, variando de acordo com a cultivar. As sementes, geralmente duas, são recobertas separadamente pelo pergaminho (endocarpo) e envolvidas por uma mucilagem (mesocarpo) relativamente aquosa e doce. Comercialmente, o interesse pelo fruto do café concentra-se no endocarpo que é denominado grão, após os processos de pós-colheita como despulpamento e torrefação (ALVES, 2008; CORTEZ, 2001; COSTE, 1955, FREE, 1993; KLEIN et al., 2003). O sistema radicular é composto por raízes pivotantes que podem alcançar até 2 metros de profundidade, mas não apresenta padrão de distribuição definido (COSTE, 1955).

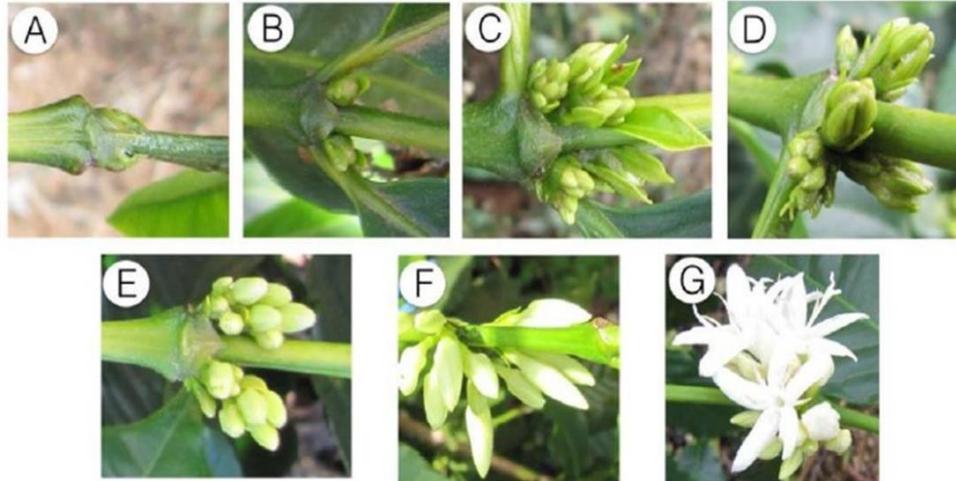
2.3 Fenologia reprodutiva de *Coffea arabica*

O cafeeiro Arábica é um arbusto lenhoso e perene com o ciclo fenológico extremamente complexo. A elaboração de esquemas e escalas para melhor compreensão das etapas de crescimento e desenvolvimento foram necessárias posto que, (i) as fases vegetativa e reprodutiva ocorrem simultaneamente e (ii) as etapas de floração e frutificação ocorrem ao longo de dois anos, diferindo da maioria das espécies que completam esses eventos no mesmo ano fenológico (GOUVEIA, 1984). Portanto, as fases vegetativa e reprodutiva foram divididas por Camargo & Camargo (2001) em seis fases, de acordo com as condições tropicais do Brasil. A caracterização do desenvolvimento reprodutivo da espécie também foi realizada devido ao número de etapas que acontecem desde a indução floral até a maturação dos frutos. Morais et al (2008) descreveram detalhadamente a fase reprodutiva de *Coffea arabica*, dividindo,

inicialmente, em 4 grandes fases: desenvolvimento da gema floral (G); floração (FL); frutificação (F) e maturação (M). Com o intuito de determinar os estádios de desenvolvimento nas fases G, F e M, novas subdivisões resultaram na classificação das gemas por tamanho, dos frutos por tamanho e dos frutos por coloração, respectivamente. Não existe subdivisão para a fase de floração pois essa etapa na escala reprodutiva é, em suma, o período de abertura do botão floral até o fenecimento da flor.

A escala fenológica reprodutiva tem início na última fase do primeiro ano, como resultado do encurtamento dos dias entre os meses de abril a agosto. A redução no fotoperíodo atua como sinal para indução floral, promovendo a indução das gemas axilares vegetativas em gemas reprodutivas, ou seja, a transição da fase vegetativa para reprodutiva. A percepção desse estímulo configura a etapa de evocação floral, e a partir desse ponto alterações morfofisiológicas produzem os primórdios florais, tornando possível a distinção visível entre gemas vegetativas de gemas florais (BERNIER et al., 1981; KRAJEWSKI; RABE, 1995; LIVRAMENTO, 2010; MELO; SOUZA, 2011; MORAIS et al., 2008; RENA & BARROS, 1986; CAMARGO & CAMARGO, 2001). Na última etapa da transição, denominada iniciação floral, transformações consecutivas durante aproximadamente 60 dias promovem o crescimento da gema floral (ALVES et al., 2003; CANNELL, 1985). Assim: (1) o estágio G1 faz referência aos nós com gemas indiferenciadas; (2) o estágio G2 faz referência aos nós com gemas intumescidas; (3) o estágio G3 agrupa gemas com até 3mm de comprimento; (4) o estágio G4 agrupa gemas com comprimento entre 3,1 e 6mm; (5) o estágio G5 agrupa gemas entre 6,1 a 10 mm e apresentam coloração verde claro, diferindo da tonalidade verde dos estádios anteriores; (6) o estágio G6 compreende a última etapa de desenvolvimento da gema, que possui comprimento acima de 12 mm e coloração branca (Figura 1). Portanto, essas são as fases dentro do desenvolvimento floral que antecede a antese (MORAIS et al., 2008; LIVRAMENTO, 2010).

Figura 1 – Escala de desenvolvimento das gemas e botões florais de *Coffea arabica*.



Legenda: Estádios de desenvolvimento de flores em *Coffea arabica* segundo Morais et al (2008). (A) Gemas indiferenciadas (estádio G1), (B) Nós com gemas intumescidas (estádio G2), (C) Botões florais com até 3 mm de comprimento (estádio G3), (D) Botões florais de 3,1 a 6 mm de comprimento (estádio G4), (E) Botões florais de 6,1 a 10 mm de comprimento (estádio G5); (F) Botões florais maiores que 10 mm de comprimento (estádio G6), (G) Flor (botão floral após antese).

Fonte: Lima (2015).

Ainda na fase 2, nos meses de julho e agosto, ocorre um evento bem característico e peculiar do florescimento: a dormência das gemas. Nesse período, as gemas florais permanecem em repouso e cessam o crescimento durante algumas semanas (CAMARGO & CAMARGO, 2001). A retomada do crescimento e desenvolvimento das gemas ocorre após alteração no ‘status’ hídrico da planta causado pelo aumento na disponibilidade de água, em função da precipitação ou irrigação. Então, de 8 a 15 dias após o choque hídrico, a elevação no potencial hídrico promove a quebra da dormência das gemas no estágio de desenvolvimento 4, maduras e aptas a florescer. Esse evento marca o início da primeira fase (setembro-dezembro) dentro do 2º ano fenológico e a última fase que engloba o processo de floração. Logo após a antese, cerca de 94% das flores são fecundadas dando início a um novo evento dentro da fase reprodutiva: a frutificação (CAMARGO & CAMARGO, 2001; KUMAR, 1979; LIVRAMENTO, 2010).

O desenvolvimento dos frutos é um processo longo, compreende os meses de setembro a março, entre a 3ª e 5ª fase do 2º ano fenológico. O crescimento do fruto inicia após a fecundação, com sucessivas divisões e alongações das células do perisperma e endosperma, originando os chumbinhos (F1 – até 3mm) e induzindo a expansão dos frutos (F2 – 3,1mm a F – 15mm). Na fase quatro, ocorre a formação dos grãos a partir da solidificação dos líquidos internos (F6 – maior que 15mm) e na fase cinco do ciclo fenológico inicia a última fase do desenvolvimento reprodutivo, a maturação (MORAIS et al., 2008; CAMARGO & CAMARGO (2001). Diversos processos metabólicos modificam a composição química do fruto, alterando

a coloração do exocarpo e a quantidade de sacarose e proteínas de reserva disponíveis para o endocarpo. Nesse processo, a coloração verde (M1) desde o chumbinho é alterada para verde-cana (M2), quando se torna visível a processo de maturação. Em seguida, o estágio M3 é designado para os frutos fisiologicamente maduros, denominados de “cereja”. Entretanto, a coloração do exocarpo no estágio cereja será vermelho ou amarelo, dependendo da cultivar. Na M4, os frutos apresentam início de desidratação apresentando aspecto semelhante a “passa”. Finalmente, a continuidade da desidratação provoca a seca generalizada na M5, gerando a coloração escura do exocarpo e a queda dos frutos (MORAIS et al., 2008).

Um ponto sobre a fisiologia reprodutiva desta espécie que convém salientar é a relação entre a quantidade de gemas axilares e a produtividade das lavouras. De acordo com (BARROS, 1997), a capacidade de produção do cafeeiro está associada com a relação fonte-dreno existente entre frutos e folhas. A demanda para formação e enchimento do fruto atua como forte dreno desviando maior porcentagem de fotoassimilados para o desenvolvimento reprodutivo. A sobrecarga na produção dos frutos resulta em safra positiva, mas é acompanhada pela seca dos ramos e morte das raízes (DaMATTA et al., 2008). Considerando que a fase vegetativa ocorre simultaneamente com a reprodutiva, o investimento no crescimento da planta é afetado pela exaustão das reservas energéticas. Logo, há redução no número de gemas vegetativas e na formação de novos ramos para o ano fenológico seguinte (MENDONÇA et al., 2011.; PEREIRA, et al., 2011). Desse modo, o volume da safra é afetado, diretamente, pelo número de flores produzidas a partir dos ramos e gemas formadas no ano fenológico anterior (THOMAZIELLO et al., 2000). A consequência do ano de alta produção é uma safra negativa logo no ano seguinte, com redução na produtividade em virtude da ausência de novos ramos para o desenvolvimento dos frutos (MENDONÇA et al., 2011.; PEREIRA, et al., 2011). Nesse caso, os fotoassimilados são destinados com maior intensidade ao crescimento vegetativo, com investimento na emissão de ramos laterais e recomposição das reservas energéticas (AUGUSTO & SILVA, 2013; PICINI et al., 1999; RENA & MAESTRI, 1985). Com a recuperação da planta, a quantidade de meristemas axilares não é mais um fator limitante para o número de inflorescências e elevada produtividade. A oscilação na carga produtiva dos cafezais determina os anos de produção como bienal positivo ou bienal negativo (GOUVEIA, 1984; LEITE et al., 2004). Obviamente existem outros fatores relativos à planta como o vingamento floral e pegamento do fruto que afetam a produtividade dos cafeeiros, bem como fatores ambientais como extremos de temperatura e nutrição (VALADARES et al., 2013). No entanto, quando se analisa a bienalidade de produção o principal fator associado é o balanço entre o crescimento vegetativo e a capacidade de desenvolvimento reprodutivo.

2.4 Florescimento do cafeeiro: interação entre o status hídrico e a regulação da biossíntese de etileno

Diversos fatores ambientais tem sido relatados como estímulo para indução de alterações morfofisiológicas que ocorrem no período de transição da fase vegetativa para a reprodutiva, bem como, dentro da fase reprodutiva (RENA et al., 1985; LIVRAMENTO, 2010; MELO & SOUZA, 2011). Temperatura e disponibilidade hídrica são alguns dos fatores exógenos que influenciam diretamente a dinâmica do florescimento e, conseqüentemente, o comportamento fenológico da cultura (RENA; BARROS, 2004). A chuva tem sido registrada como fator determinante para desencadear o retorno do crescimento dos botões florais e uma das prováveis causas seria a redução da temperatura que costuma acompanhar as chuvas (BROWNING, 1977; RENA; MAESTRI, 1986; NASCIMENTO, 2006; GARDIN, 2006; CARVALHO, 2008; REIS, 2010). Entretanto, em condições de campo a implementação da irrigação mostrou-se tão eficiente quanto às chuvas para controlar o processo de floração sem, contudo, haver influência do manejo da rega sobre a temperatura (GUERRA et al., 2005; SOARES et al. 2005; CARVALHO, 2008). Um dos fatores determinantes para a floração no cafeeiro é o status hídrico da planta (MAGALHÃES; ANGELOCCI, 1976; CRISOSTO et al., 1992). Quanto a isso, sabe-se que a restrição severa de água associada à elevadas temperaturas causa a desidratação e abortamento dos botões florais (ALVIM, 1960; RAMÍREZ et al., 2011); enquanto que cafeeiros hidratados com frequência ou afetados por chuvas esporádicas produzem muitas floradas de intensidade variável (RENA; MAESTRI, 1985; PEREIRA et al., 2008). Também foi observado que a hidratação continua dos cafeeiros não favoreceu o progresso no desenvolvimento das gemas para os estádios posteriores ao G4. Isso indica que a ausência do déficit hídrico impossibilitou a conclusão dos estádios finais de desenvolvimento dos botões florais (CRISOSTO et al., 1992).

Quando cafeeiros foram cultivados em casa de vegetação e submetidos ao fracionamento do sistema radicular (*root-split*) ficou evidenciado a necessidade de um evento de seca dentro da fase reprodutiva dessa espécie. Nessa técnica o sistema radicular de cada planta foi dividido em dois vasos e submetido a diferentes condições hídricas (irrigados e/ou sob restrição hídrica) (CRISOSTO et al., 1992). Foi constatada indução floral culminando em antese apenas nas plantas que tiveram parte do sistema radicular hidratado e parte do sistema radicular mantido sobre seca. Esse resultado indicou que existem outros fatores associados ao florescimento além do “status” da planta, possivelmente fatores endógenos, uma vez que, plantas constantemente irrigadas não reduziram seu potencial hídrico e não floresceram. De

modo semelhante, plantas mantidas constantemente sob seca reduziram seu potencial hídrico, mas também não floresceram. Como já relatado, apenas as plantas submetidas às duas condições hídricas floresceram, sem apresentar redução no potencial hídrico foliar (CRISOSTO et al., 1992). Vários trabalhos na literatura relatam que para obtenção de uma florada mais uniforme os cafeeiros necessitam de um período com restrição hídrica seguido por precipitação ou irrigação, afim de quebrar a dormência e desencadear a antese (ALVIM 1960; MAGALHÃES; ANGELOCCI 1976; GUERRA et al., 2005). A suspensão da irrigação no período de 24 de junho a 1º de setembro mostrou-se eficiente para genótipos de *Coffea arabica*, resultando na sincronização no desenvolvimento das gemas reprodutivas, obtendo-se potencial hídrico de -2,3MPa e ocorrência de antese cerca de 12 dias após o retorno da irrigação. Esse manejo resultou em florada única e uniforme nesse tratamento com carga de frutos cereja superior a 80% (SOARES et al., 2005; GUERRA et al., 2005; GUERRA et al., 2007).

A fase de dormência, nas condições tropicais do Brasil, coincide com o período seco sendo sugerido que a combinação desses fatores é favorável para o desenvolvimento das gemas até o estágio G4 (RENA; MAESTRI, 1985; CAMARGO & CAMARGO, 2001). O foco nesse estágio de desenvolvimento floral deve-se aos relatos de que essas gemas são capazes de responder a diferentes estímulos tornando-se sensíveis, por exemplo, a variações na disponibilidade de água (ALVIM, 1960; CRISOSTO et al., 1992). Portanto, a imposição de um déficit hídrico adequado estaria relacionada com a promoção de uniformidade no desenvolvimento das gemas, permitindo que o maior número delas alcancem conjuntamente o estágio G4, tornando-se competentes para responder a reidratação e promover um evento de florada mais concentrado (MES, 1957; DaMATTA; RAMALHO, 2006). A responsividade das gemas em estágio G4 parece estar vinculada ao desenvolvimento de um feixe vascular contendo maior quantidade de xilema secundário, permitindo a interação dessas gemas com estímulos provenientes da raiz durante ou após um período de restrição hídrica (ALVIM, 1960; CRISOSTO et al., 1992). Ainda que as plantas não sejam submetidas a um déficit hídrico severo, a limitação na oferta de água pode alterar o seu metabolismo, já sendo bem discutido que o estresse por seca modifica os níveis endógenos de diversas moléculas, incluindo os hormônios (ALBACETE et al., 2014) como o Ácido Abscísico (SANGTARASH et al., 2009) e o Etileno (ABELES & MORGAN, 1992).

A biossíntese e o fluxo do hormônio etileno tem sido alterada em muitas espécies quando submetidas à seca (YANG et al., 2014). Observou-se o acúmulo de ACC (precursor imediato do etileno) em raízes de mudas de citros quando submetidas ao estresse hídrico. Nesse caso, após a reidratação das mudas houve um rápido e intenso aumento nos níveis de etileno na

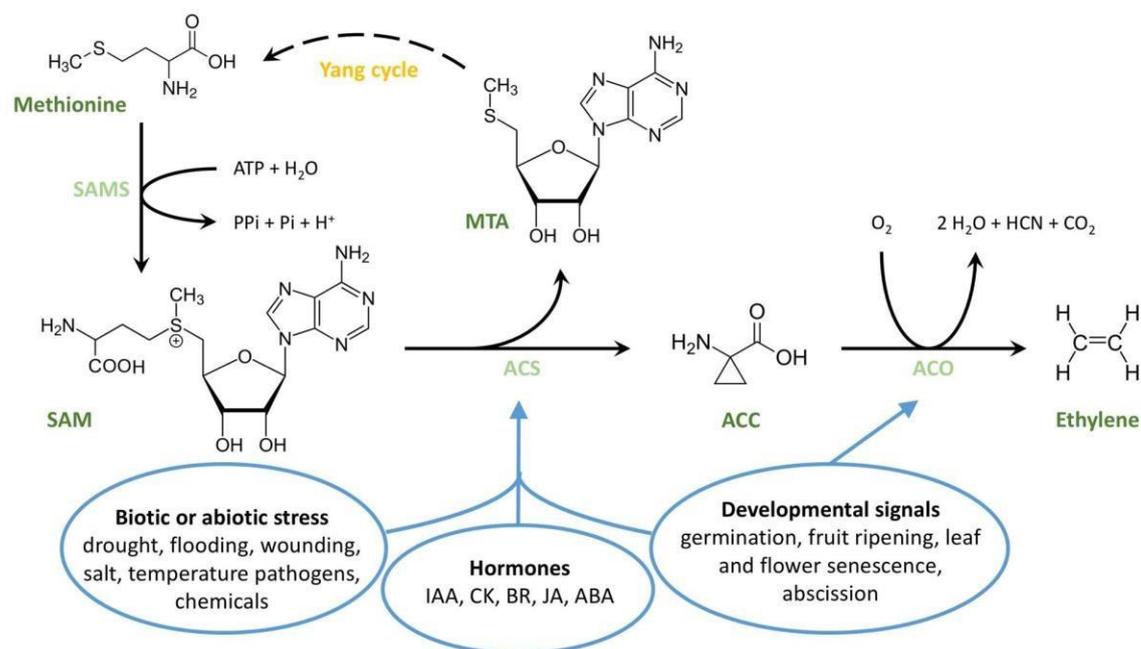
parte aérea, provavelmente promovido pelo transporte do ACC da raiz para a parte aérea (GOMEZ-CADENAS et al., 1996). A expressão dos genes da rota do etileno parece ser positivamente regulada por períodos de seca seguidos por reidratação, desse modo, os genes responsáveis à reidratação promoveriam a antese pelo aumento nos níveis de etileno nos órgãos florais. Esse mecanismo foi sugerido como o sinal que desencadeou a abertura floral em rosas (LIU et al., 2013; MENG et al., 2014). Considerando os requisitos necessários para obtenção da antese no cafeeiro, ou seja, um período seco seguido por reidratação, Crisosto et al (1992) sugeriram que o estímulo para abertura floral nessa espécie é desencadeado por um sinal produzido nas raízes de plantas de café sob seca e “ativado” após a reidratação das plantas.

Nesse contexto, a água desempenharia um papel essencial no processo de florescimento do cafeeiro atuando como um transportador, conduzindo o sinal produzido nas raízes para a parte aérea. Este sinal seria o estímulo para a quebra da dormência, permitindo a retomada do crescimento das gemas e tornando o botão floral competente para antese. Considerando as exigências para a antese no cafeeiro, Lima (2015) submeteu mudas de *Coffea arabica* ao estresse hídrico seguida por reidratação e constatou expressão diferencial de genes envolvidos na rota de biossíntese e sinalização do etileno, havendo aumento na expressão desses genes em folhas e raízes. Com base nisso, o autor sugeriu que o etileno poderia estar envolvido no controle da promoção da antese do cafeeiro, e o mecanismo associado a esse evento seria o acúmulo do ACC nas raízes durante o déficit hídrico. Nesse processo, a importância da reidratação seria viabilizar a translocação via xilema do ACC para a parte aérea e além de promover o aumento do potencial hídrico das gemas, elevaria a concentração de etileno nos botões, culminando na abertura floral.

2.5 Etileno: da biossíntese à regulação de processos fisiológicos

A bioquímica da biossíntese do etileno (C₂H₄) resume-se em duas vias principais (BLEECKER & KENDE, 2000a) mas o caminho para iniciar esse processo começa a partir da metionina (ADAMS & YANG, 1979; LIEBERMAN et al., 1965) e em razão da dependência desse aminoácido, as reações de reciclagem da metionina no ciclo de Yang (YANG & HOFFMAN, 1984) são comumente associadas a rota de biossíntese do etileno (Figura 2).

Figura 2 – Visão estrutural da biossíntese do etileno.



Fonte: Vanderstraeten & van Der Straeten (2017).

A formação desse hormônio depende da conversão da metionina em S-adenosilmetionina (SAM), reação catalisada pela enzima L- metionina- S-adenosiltransferase (SAMS) (MIYAZAKI; YANG, 1984; ADAMS et al., 1977), requerendo uma molécula de adenosina trifosfato (ATP) por molécula de SAM sintetizada, o que exige um aumento no metabolismo respiratório para suprir a demanda energética desse processo (BARRY; GIOVANNONI, 2007; MIYAZAKI; YANG, 1987; WANG et al., 2002). Em seguida, S-Adomet é convertida em ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) pela enzima sintase do 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACS – ACC sintase) (ADAMS & YANG, 1981; BOLLER et al., 1979). O ACC é um aminoácido cíclico não protéico que atua como precursor direto do etileno (MORRIS et al., 1966; VANDERSTRAETEN & VAN DER STRAETEN, 2017). Em consequência da sua formação, uma molécula de 5-Metil-tioadenosina (MTA) é liberada para cada reação da ACC sintase. O MTA retorna para reciclagem (ciclo de Yang) e fornece os grupos enxofre e metila da SAM essenciais para síntese da metionina (BÜRSTENBINDER et al., 2010; MIYAZAKI & YANG, 1987). A enzima formadora do ACC, ACS, integra a família de enzimas dependente de piridoxal-5-fosfato (PLP). A ligação do cofator PLP no sítio catalítico induz a clivagem de uma molécula de MTA da SAM pela ACS, e desse modo o anel ciclopropano requerido pelo ACC é liberado (LIANG et al., 1992; YU et al., 1979).

Com a formação do precursor, o etileno é produzido através da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato oxidase (ACO – ACC oxidase), que durante muitos anos foi denominada de Enzima Formadora do Etileno (EFE) (JOHN et al., 1985; VERVERIDIS & JOHN, 1991), visto que catalisa a etapa final de síntese do etileno (YANG & HOFFMAN, 1984; RUDUŠ et al., 2013). A denominação de EFE era, de fato, uma ênfase a atividade desta enzima que garantia a produção do etileno a partir do ACC, uma vez que, o ACC também atua como substrato em outras vias podendo ser convertido em malonil-ACC (MACC); γ -glutamil-ACC (GACC) ou jasmonil-ACC (JA-ACC) (MARTIN & SAFTNER, 1995; STASWICK & TIRYAKI, 2004). A ACC oxidase integra a superfamília das dioxigenase 2-oxoglutarato-dependente (2OGD), grupo de enzimas que não possui ferro heme (KAWAI et al., 2014). Em virtude disso, o ferro (II) é um elemento essencial para a atividade da enzima (BOUZAYEN et al., 1990; BRISSON et al., 2012). O ascorbato é um cofator importante para romper o anel do ACC (ZHANG et al., 2004), e o bicarbonato e oxigênio molecular são necessários para ativar a conversão do ACC em etileno (ADAMS & YANG 1981; PEISER et al., 1984). Nesse processo, libera-se dióxido de carbono (CO₂) e íon cianeto (CN⁻), que por ser reativo é rapidamente convertido em β -cianoalanina (MURPHY et al., 2014; PEISER et al., 1984).

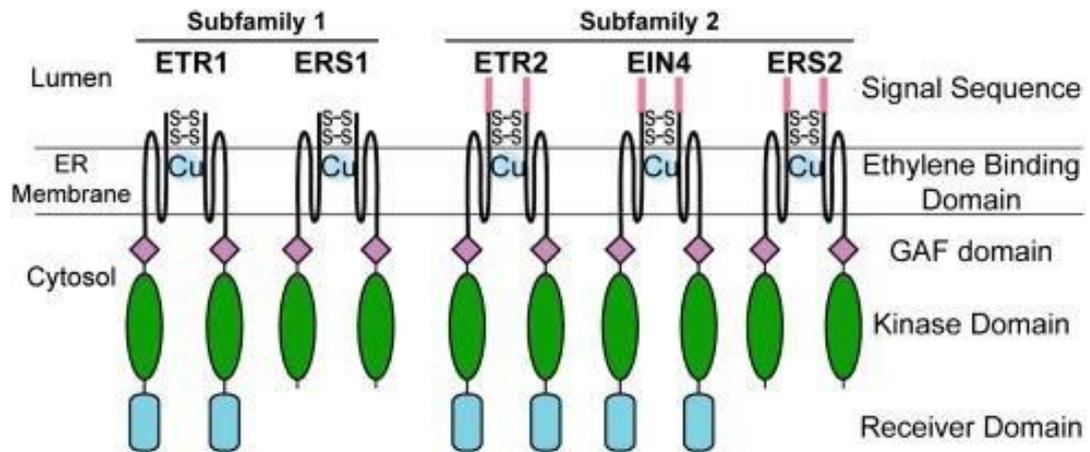
As enzimas da via de biossíntese são reportadas como membros de famílias multigênicas e podem ser diferencialmente expressas durante as fases de crescimento e desenvolvimento das plantas, bem como reguladas por tensões bióticas, abióticas e em resposta a interações hormonais (GÓMEZ-LIM et al., 1993; TSUCHISAKA & THEOLOGIS, 2004; VAN DER STRAETEN et al., 1992; DUGARDEYN et al., 2007). Em *Arabidopsis thaliana*, a análise do genoma identificou 12 genes ACS (ACS1-ACS12) mas apenas 8 codificam homodímeros funcionais (KAUL et al., 2000; YAMAGAMI et al., 2003). Quanto á enzima ACO, a análise completa do genoma identificou 13 loci possíveis para codificar genes ACO, mas a atividade funcional de todas as isozimas ainda não está confirmada (GÓMEZ-LIM et al., 1993; LINKIES et al., 2009; PARK et al., 2018).

Como produto final, o etileno é capaz de coordenar múltiplos processos no ciclo de vida do vegetal, desde germinação das sementes até senescência de órgãos. Ele pode ser produzido naturalmente em qualquer tecido de plantas superiores, difundindo-se facilmente por se tratar de um composto volátil (ABELES et al., 1992; VILAS BOAS, 2002; CHEN et al., 2005; TANG et al., 2008; MA et al., 2014). Entretanto, para desencadear as respostas fisiológicas, a percepção do hormônio pelos receptores é crucial (HALL et al. 2007). O principal modelo para compreensão da via de percepção e transdução de sinal surgiu em *Arabidopsis thaliana* com identificação e clonagem do gene ETR1 (CHANG et al. 1993). A partir disso, descobriu-se

outros quatro genes com atividade relacionada ao ETR1: ETR2, ERS1, ERS2, EIN4 (HUA & MEYEROWITZ, 1998; SAKAI et al., 1998). Embora redundante em função, a diferença estrutural existente quanto ao número de regiões inter-membranas e ao tipo de atividade cinase permitiu a separação desses receptores em dois grupos (BLEECKER, 1999; SHAKEEL et al., 2013). A subfamília 1 é composta por receptores que possuem três subdomínios hidrofóbicos de ligação ao etileno na região N-terminal e motivos de aminoácidos para histidina cinase. Já os receptores da subfamília 2 possuem uma extensão dessa região hidrofóbica que parecem atuar como uma sequência de sinal e motivos de aminoácidos para atividade Serina/Treonina cinase (LIN et al., 2009; MOUSSATCHE & KLEE, 2004; O'MALLEY et al., 2005). Apesar da falta de unanimidade entre os pesquisadores sobre a real importância da atividade cinase, a diferença estrutural nos receptores ainda é um parâmetro para classificação (QU & SCHALLER, 2004; WANG et al., 2003). Desse modo, ETR1 e ERS1 integram a subfamília 1 e ETR2, EIN4 e ERS2 integram a subfamília 2 (CHANG & STADLER, 2001; GUO & ECKER, 2004; LACEY & BINDER, 2014a).

Quanto aos demais componentes estruturais, as cinco isoformas de receptores de etileno analisados em *Arabidopsis* possuem dentro do domínio de ligação ao etileno uma molécula de cobre, que atua como cofator da reação, auxiliando o ligante ao sítio receptor (BLEECKER et al., 1998). Os domínios GAF (fosfodiesterases específicas de cGMP, adenilil ciclases e FhlA), importante para mediar interação proteína-proteína relatada como essencial para atividade, estão presentes nos receptores das duas subfamílias e localizados no citoplasma (BLEECKER, 1999; MÜLLER-DIECKMAN, 1999). No entanto, os receptores ETR1, ETR2 e EIN4 possuem uma extensão na região C-terminal denominada “receptor adicional”, que até o presente não está caracterizada, mas esse componente não está vinculado ao tipo da família, bem como parece não influenciar nas atividades dos receptores (LACEY & BINDER, 2014b; MOUSSATCHE & KLEE, 2004). Como descrito no modelo de *Arabidopsis*, o etileno é percebido por uma família de receptores na maioria das plantas estudadas. Esses receptores estão localizados, predominantemente, nas membranas do retículo endoplasmático, mas é possível que também estejam presentes em outras membranas das células (Figura 3). Apesar de se difundir em ambientes aquosos, o gás etileno é lipofílico e como o sítio de ligação está inserido nas endomembranas, não há exigência da presença dos receptores na superfície celular (CHANG, 2016b; LACEY & BINDER, 2014; MA et al., 2006).

Figura 3 – Características estruturais dos receptores das subfamílias de *Arabidopsis thaliana*.



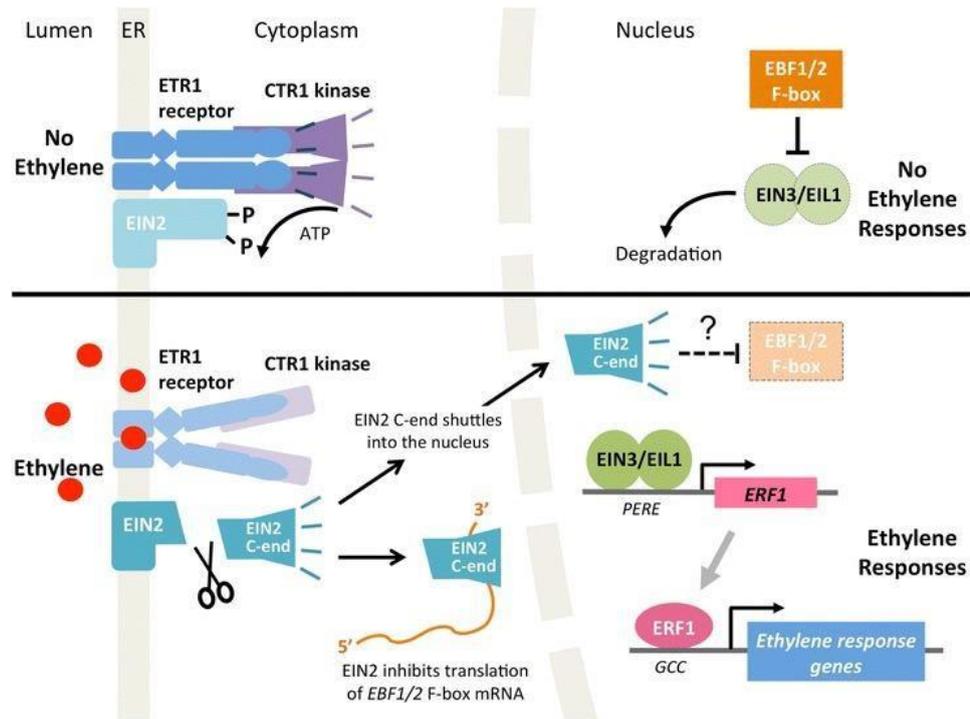
Fonte: Lacey & Binder (2014b).

A via de sinalização do etileno é regulada negativamente, ou seja, os receptores são reguladores negativos da resposta ao etileno (ALONSO et al. 1999; HUA & MEYEROWITZ, 1998; KIEBER et al., 1993; TIEMAN et al., 1999.). Na ausência do hormônio (Figura 4), esses receptores permanecem ativos e interagem com a região N-terminal da proteína cinase *Constitutive Triple Response 1* (CTR1) (HUANG et al., 2003; KIEBER et al., 1993). Desse modo, CTR1 que atua a jusante dos receptores, fosforilando o domínio C-terminal da proteína *Etileno Insensitivo 2* (EIN2), um importante regulador positivo da via (JU et al., 2012; WEN et al., 2012). Com isso, o fator de transcrição *Etileno Insensitivo 3* (EIN3) ou *EIN3-like 1* (EIL1) é degradado via proteossoma 26S, no núcleo, pelas proteínas F-box de ligação a EIN3 1/2 (EBF1/2), reprimindo as respostas ao hormônio (AN et al., 2010; POTUSCHAK et al., 2003).

Na presença de etileno (Figura 4), a ligação ao sítio ativo dos receptores altera sua estrutura conformacional tornando-os inativos, e conseqüentemente, reprimindo a atividade da proteína CTR1 (GAO et al., 2003; STEPANOVA et al., 1998). Essa regulação funciona como um mecanismo “chave-fechadura”, onde a ligação do etileno desbloqueia a via de sinalização a jusante (BLANKENSHIP, 2001). A desfosforilação da EIN2 remove a supressão causada pela CTR1 e alivia a repressão sobre os demais componentes da via, ativando o fator de transcrição a jusante, *Etileno Insensitivo 3* (EIN3) ou *EIN3-like 1* (EIL1) (GAO et al., 2003; STEPANOVA & ALONSO, 2005). EIN3/EIL1 são acumulados no núcleo e estabilizados ao se ligar a genes que possuem a sequência de “elemento primário de resposta ao etileno (PERE)” (JU et al., 2012; QIAO et al., 2012). Essa sequência PERE está presente na região promotora dos genes que integram a grande família de genes *Ethylene Response Factor* (ERF), a exemplo do ERF1. Genes que possuem a sequência PERE integram a superfamília de fatores de

transcrição denominada proteínas de ligação de elementos em resposta ao etileno (EREBPs). Nesse caso, a atividade do ERF1 reside em ligar-se aos motivos de DNA altamente conservados, região *GCC box*, presentes em genes envolvidos na resposta via etileno (RIECHMANN et al., 2004; HAO et al., 1998; SOLANO et al., 1998).

Figura 4 – Modelo da via de sinalização do etileno.



Legenda: Os receptores, a exemplo do ETR1, localizam-se nos retículos endoplasmáticos e na ausência de etileno ativam a proteína quinase CTR1, reprimindo a função do EIN2. Dessa forma, os fatores de transcrição primário EIN3 / EIL1 são degradados e as respostas ao etileno reprimidas. Contrariamente, na presença de etileno, o receptor ETR1 é desativado e a proteína CTR1 reprimida. O bloqueio dos reguladores negativos ativa a via de transdução de sinal a jusante da CTR1, ativando EIN2 que é transportada para o núcleo e bloqueia as proteínas F EBF1/2. Desse modo, EIN3 / EIL1 são estabilizados e regulam fatores de transcrição secundários como o ERF1, coordenando as respostas ao etileno
Fonte:Chang, (2016a).

2.6 Etileno na regulação do florescimento

A evolução fenológica é acompanhada por uma série de processos fisiológicos que resultam da integração de sinais endógenos e exógenos. Nesse cenário, a transição de fase entre os períodos vegetativo e reprodutivo é marcado pela conversão do meristema apical da parte aérea em meristema floral ou de inflorescência (SRIKANTH; SCHMID, 2011; BERNIER, 1988; MCDANIEL et al., 1992).). A mudança entre esses estádios é definida pela proliferação e diferenciação das células, iniciando um processo definitivo que acarretará na evocação floral e formação das gemas florais (CHANDLER, 2014). No geral, as plantas dispõem de diferentes

vias ou mecanismos para controle do florescimento, dentre os quais: vernalização, fotoperíodismo e giberelinas (POSÉ et al., 2012; SRIKANTH; SCHMID, 2011).

O controle via giberelina (GA) é uma rota de regulação hormonal com participação efetiva do etileno. Em *Arabidopsis*, a elevação nos níveis de etileno induziu a degradação das giberelinas pelo proteossomo 26S promovendo o acúmulo das proteínas DELLA e retardando o florescimento (ACHARD et al., 2007). A concentração de transcritos DELLA foi maior em rosas que exibiram atraso na abertura floral (LUO et al. (2013), e inevitavelmente associou-se as proteínas DELLA como regulador negativo do florescimento (FUKAZAWA et al., 2014; YU et al., 2012;). De fato, a interação DELLA-GA é inversamente proporcional, de modo que, na ausência de GA essas proteínas bloqueiam os genes LEAFY e SOC1 envolvidos com a sinalização para ativação de genes de identidade floral (CAO et al., 2006; ACHARD et al.,

2007; O'MAOILEIDIGH et al., 2014). Esse foi o mecanismo descrito para controle do florescimento nessas espécies e a regulação da via, embora com destaque para giberelina, é coordenada pelos níveis de etileno. Com efeito, o florescimento é um dos eventos fisiológicos influenciados pelo etileno e de acordo com alguns trabalhos, o efeito desse hormônio no

desenvolvimento floral é divergente entre as espécies e parece ser dependente da sua concentração. Por exemplo, a aplicação de Ethrel[®] 720 (composto liberador de etileno) em plantas de melancia inibiu o desenvolvimento das gemas florais, afetando negativamente o

florescimento (CHRISTOPHER & LOY, 1982; DOMINGUES et al., 2000). Resultados semelhantes foram encontrados para *Arabidopsis*, onde a elevação nos níveis de etileno causou a redução nos níveis de giberelinas ativas e inibiu a transição floral (ARCHARD et al., 2007).

Por outro lado, o aumento nos níveis de etileno em roseiras foi indicado como o sinal que conduziu a antese (LIU et al., 2013; MENG et al., 2014). Trusov & Botella (2006) propuseram que a floração no abacaxizeiro é desencadeada pela superexpressão do gene *AcACS2* no meristema durante a indução floral, de modo que a elevação na concentração de etileno seria o estímulo para o “florescimento natural” dessas plantas em condições de campo. Li et al (2016) também verificaram que a aplicação de ethrel em abacaxizeiro resultou na expressão acentuada de receptores do etileno, a exemplo do *AcETR2a*, especialmente em tecidos de flor. Em *Coffea arabica*, abertura floral foi observada após pulverização do 1-Metilciclopropeno (1-MCP), inibidor da ação do etileno. Esse produto promoveu picos na expressão de genes da via de biossíntese e sinalização do etileno em folhas e gemas 2h após pulverização (LIMA, 2015; SANTOS, 2016).

2.7 1-Metilciclopropeno e a indução da antese no cafeeiro

O 1-Metilciclopropeno (1-MCP) é um potente antagonista da ação do etileno (FENG et al., 2004; SEREK; SISLER, 2001). Esse composto integra o grupo do ciclopropenos (CPs), uma classe de moléculas eficiente em prevenir os efeitos deletérios do etileno nas plantas (SISLER; SEREK, 1999; SISLER et al., 1996) A efetividade dos bloqueadores CPs deve-se ao sistema competitivo que exercem nos receptores do etileno, localizado nas membranas celulares (BLANKENSHIP;DOLE, 2003; WATKINS, 2008) Essas moléculas ligam-se de modo irreversível nos sítios de ligação do etileno, mas são incapazes de desativar o componente a jusante da via metabólica e desencadear respostas fisiológicas. Quando o 1-MCP (C_2H_6) está ocupando o sítio receptor é impossível que o etileno se ligue ao mesmo tempo (SISLER;SEREK, 1997). Assim, a via de sinalização permanece bloqueada na ausência de ligação do etileno nos sítios receptores. Desse modo, o etileno é incapaz de desencadear reações químicas inibindo as respostas nas plantas por um longo período de tempo (SEREK;SISLER, 2001; SISLER et al., 2003). Porém, a sensibilidade ao hormônio pode ser reestabelecida conforme novos receptores sejam sintetizados (HALL et al., 2000; SISLER, 2006; BLANKESHIP, 2001)

A potencialidade do 1-MCP é destacada dentro da classe dos CPs (SISLER et al., 2003). O 1-MCP e 3-MCP são isômeros que possuem mesma fórmula empírica mas características estruturais diferentes (HE et al., 2019). Esses compostos mantem a mesma propriedade, porém a velocidade de ação do 1-MCP é maior. Ainda não se sabe se as respostas menos eficientes obtidas pelo 3-MCP deve-se a presença do grupo metil na posição 3 ou a falta dele na posição 1, ou ambos. O fato é, a molécula C_2H_6 na estrutura de 1-MCP demonstra atividade biológica mais eficiente além de requerer menor concentração para executar a mesma função que o 3-MCP. Este último necessita de concentração 5 a 10 vezes maior que o 1-MCP (SISLER et al., 1999). A eficácia funcional do 1-MCP resulta da afinidade pelo receptor que é cerca de 10 vezes superior ao etileno. Isso justifica a maior conexão com os receptores e a necessidade de concentrações menores para exercer sua função, uma vez que, as moléculas de 1-MCP possuem rápida difusão nos tecidos vegetais e meia vida variando entre 7 e 12 dias enquanto a duração da ligação do etileno é efetiva por no máximo 10 minutos (BLANKENSHIP; DOLE, 2003; KEBENEI et al., 2003).

O 1-MCP, de fórmula C_2H_6 e massa molar de 54g, é estruturalmente muito similar ao etileno. É estável à temperatura e pressão ambiente, e considerado um composto atóxico, inodoro, incolor e não gerador de resíduos (WATKINS,2006; BLANKENSHIP, 2001). Comercializado em pó durante muitos anos, a formulação era hidratada no momento do uso, liberando o 1-MCP gasoso nos tecidos vegetais após pulverização (BLANKENSHIP;DOLE,

2003; BURNS,2008). Desde a sua descoberta como inibidor da ação do etileno na década de 90 (SISLER; BLANKENSHIP, 1996), o 1-MCP tem sido comercializado como EthylBloc® pela Floralife (Walterboro, SC) e utilizando extensivamente em culturas ornamentais, principalmente flores de corte, visando retardar a senescência e prologar a viabilidade na pós-colheita (ÇELIKEL et al., 2002; GALATI et al. 2017; HOU et al. 2012; FAVERO et al. 2016; Há et al., 2019). Em culturas comestíveis, o 1-MCP tem sido utilizado no ramo da horticultura e fruticultura, a fim de garantir a qualidade do alimento, aumentar o tempo de armazenamento e de prateleira (CAI et al., 2006; ÖZKAYA et al., 2016; PAK DEK et al., 2018; WIN et al., 2019). As primeiras experiências nesse ramo foram realizadas pela Agrofresh (Spring House, PA) sob o nome comercial de SmartFresh™ (BLANKENSHIP;DOLE, 2003). Atualmente, a empresa AgroFresh comercializa o 1-MCP na formulação líquida (GEHL et al. 2019) e essa formulação foi utilizada em cafeeiros recentemente (LIMA, 2015).

Muitos estudos relatam os efeitos benéficos do 1-MCP mas a influência que esse composto exerce sobre os processos de respiração, degradação de clorofila, amaciamento do fruto, produção de voláteis e a produção de etileno (CIN et al., 2006; GOLDING et al., 1998; GUILLÉN et al., 2007; JEONG, 2002; TIAN et al., 2000) dependem de diversos fatores como a espécie, cultivar e estágio de desenvolvimento (BLANKENSHIP;DOLE, 2003). O estudo de Lima (2015) foi o primeiro a reportar a indução na transcrição de genes do etileno promovidos pelo 1-MCP e seu efeito sobre a antese do cafeeiro. A hipótese para utilização do 1-MCP no cafeeiro surgiu das exigências para a floração da espécie: um período seco seguida por reidratação.

Sabendo-se que ciclos de desidratação e reidratação promoveram a elevação nos níveis de etileno, culminando na abertura floral em rosas (MENG et al., 2014), Lima (2015) considerou as informações fornecidas nas experiências de Crisosto et al. (1992) e Tudela e Primo-Millo (1992), e então sugeriu que em cafeeiros, o etileno também poderia atuar como sinal para indução da abertura floral. O mecanismo de atuação proposto iniciaria, possivelmente, durante o período seco com o aumento na expressão dos genes de biossíntese do etileno, elevando a produção do ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC). Essa molécula, que é precursora do etileno, ficaria concentrado nas raízes dos cafeeiros durante a seca e após precipitação ou reirrigação, seriam transportados juntamente com água para parte aérea onde seria convertido em etileno. Nesse sentido, o etileno seria o indutor da antese no cafeeiro e a pulverização de 1-MCP bloquearia a resposta do hormônio.

O experimento conduzido por Lima (2015) foi implantado no final de agosto de 2013 na área experimental da Universidade Federal de Lavras (Lavras – MG), com plantas de *Coffea*

arabica cv. Acaiá cerrado, de 8 anos de idade e cultivadas em campo sem sistema de irrigação no campo. As plantas estavam a cerca de 60 dias sem interferência de precipitação, e a pulverização do 1-MCP na dose de 50mg de ingrediente ativo L⁻¹ foi realizada em cafeeiros em campo sem sistema de irrigação. Supreendentemente, a pulverização de 1-MCP na concentração de 50mg de ingrediente ativo L⁻¹ promoveu a abertura floral no cafeeiro. Reforçando as informações obtidas neste estudo, Santos (2016) também observou abertura floral induzida por 1-MCP em *Coffea arabica* cv Catuaí 144, de 4 anos de idade. O experimento foi implementado na Fazenda Cafuá (Ijací-MG) no início de setembro de 2015, conduzido sem sistema de irrigação. Nesse experimento, as plantas também estavam a cerca de 60 dias sem hidratação e a concentração de 1-MCP utilizada foi a mesma indicada por Lima (2015). Nesses dois estudos, o surfactante Break-Thru (BTH) foi diluído na calda de pulverização para aumentar a absorção do 1-MCP pela planta, entretanto, a antese foi verificada apenas nos cafeeiros tratados com BTH+1-MCP (Figura 5C e 5F). A antese nas plantas testemunha pulverizadas com água (Figura 5D) e água+BTH (Figura 5A e 5D) ocorreu somente após precipitação, cerca de 10 dias depois da antese promovida pelo 1-MCP Santos (2016). O mecanismo pelo qual o 1-MCP induziu a antese no cafeeiro ainda não está elucidado, mas ficou evidenciado que a promoção do florescimento ocorreu apenas nesse tratamento e possivelmente está vinculado ao controle pelo etileno. Lima (2015) e Santos (2016) sugeriram que a perda da regulação por *feedback* nas vias de biossíntese e percepção são os fatores que acarretaram na abertura floral de *Coffea arabica*.

Figura 5 – Antese em *Coffea arabica* induzida por 1-Metilciclopropeno (1-MCP).



Legenda: Na sequência de imagens superior: (A) Água+Break-Thru seis dias após pulverização (B) 1-MCP+ Break-Thru, seis dias após pulverização; (C) 1-MCP+ Break-Thru, doze dias após pulverização. Na sequência de imagens inferior: (D) Água, nove dias após pulverização, (E) Água+Break-Thru, nove dias após pulverização (F) 1-MCP+ Break-Thru, nove dias após pulverização.

Fonte: Lima (2015); Santos (2016).

2.8 Impacto da assincronia floral na economia cafeeira

O café é um produto agrícola que tem seu preço baseado em parâmetros qualitativos, e isto justifica a demanda crescente por melhorias nas etapas de cultivo, colheita e pós-colheita, visando a produção de cafés com qualidade superior (CECAFE, 2019; SIMÕES et al., 2008). Sobre esse aspecto, deve-se considerar que as características associadas à qualidade da bebida resultam da combinação de fatores ambientais, dos tratos culturais e de fatores genéticos, os quais irão determinar a composição química do grão (MENDONÇA et al., 2005; ALVES et al., 2011). A valorização dos cafés está vinculada principalmente as características organolépticas, a exemplo dos mais de 800 compostos voláteis que compõem a formação do aroma e sabor da bebida, bem como as concentrações de açúcares que variam, dentre outros fatores, pelo estágio de maturação dos frutos (CAMPA et al. 2004; FRANCA et al., 2005).

Frutos verdes são indesejáveis durante o processamento em virtude da maturação incompleta do grão, conferindo elevada adstringência a bebida, sendo classificada como de baixa qualidade, obtendo menor valor agregado no mercado. Em contraste, porcentagem superior de frutos cereja durante a colheita fornecem bebida com maior doçura e melhor acidez, obtendo pontuações mais altas na classificação da qualidade da xícara (TRUGO et al., 2000; SIQUEIRA & ABREU, 2006; PIMENTA & VILELA, 2003), sendo comumente destinado ao comércio internacional, obtendo melhor valor no mercado. Logo, o estágio de maturação do fruto no momento da colheita é um fator primordial que influencia diretamente a qualidade do produto final, uma vez que, grãos imaturos podem resultar em efeitos adversos na qualidade dos constituintes químicos da bebida de café, alterando importantes requisitos para qualificação da bebida (FAGAN et al., 2011; MARTINEZ, 2014).

Para a obtenção de cafés de alta qualidade é preferível que a colheita ocorra quando a lavoura atingir o maior volume possível de frutos no estágio cereja (BUDZINSKI et al., 2005), quando a casca, polpa e a semente alcançarão a composição química ideal. No entanto, a obtenção de lavouras com uniformidade na maturação dos frutos é inviabilizada pela ocorrência de floradas sequenciais que dificilmente podem ser controladas em condições naturais (RENA; BARROS, 2004; FREITAS, 2013). Essa assincronia é uma característica altamente indesejável no florescimento do cafeeiro, pois compromete a eficiência e rendimento da colheita, manual ou mecanizada, relacionando-se negativamente com a rentabilidade do produtor. Com muitos eventos de florada dentro de um mesmo ciclo produtivo é necessário realizar colheita seletiva ou escalonada, tornando essa etapa uma das mais onerosas da cafeicultura, podendo representar até 30% dos custos com a produção (DaMATTA et al., 2007; DIAS, 2013; De Oliveira et al., 2007). A consolidação da cafeicultura brasileira desperta expectativa dos mercados internacionais, que estão em plena expansão, sobretudo quanto a comercialização de cafés especiais. Portanto, a preocupação com o aumento da produtividade dos cafezais brasileiros deve ser acompanhada pela busca em melhoria da qualidade do produto final para atender o mercado com consumidores cada vez mais exigentes.

2.9 Controle artificial do etileno para maturação uniforme dos frutos de café

Visando solucionar a problemática na etapa de colheita do café, reguladores de crescimento têm sido utilizados para controlar e promover a maturação dos frutos (BARBOSA et al., 2011; DIAS et al., 2013). Os reguladores de crescimento são substâncias sintéticas que interferem no balanço hormonal das plantas e produzem efeitos fisiológicos semelhantes as classes de hormônios conhecidas (LEITE et al., 2011). Seu uso na agricultura é uma prática já

difundida e utilizada para diferentes finalidades (GARCIA, 2006; ALMEIDA et al., 2015). Sendo o etileno o “hormônio da maturação”, ao longo dos anos, produtos foram desenvolvidos para induzir ou retardar o amadurecimento dos frutos e desde a década de 70 essa prática tem sido adotada nas lavouras do Brasil (MONÁCO; SONDAHL, 1974).

O Ethrel® 720 (Bayer Crop Science, Laverkursen, Alemanha) é um maturador fisiológico que tem sido utilizado como produto alternativo para promover maior uniformidade na maturação dos frutos através da indução do etileno. Esse produto contém o ácido 2-cloro-etil-fosfônico (precursor do hormônio etileno), o qual é mantido estável em meio ácido com pH em torno de 1,0. Ao ser pulverizado, via foliar, e em contato com os tecidos da planta o ácido 2-cloro-etil-fosfônico é decomposto dentro das células em função da elevação do pH. O princípio ativo é liberado muito próximo dos sítios receptores do etileno, potencializando a sinalização e desencadeando rápidas respostas fisiológicas (MONÁCO; SONDAHL, 1974; FELIPE, 1986; LI; SOLOMON, 2003). Entretanto, a técnica exige o conhecimento apurado sobre o momento exato para aplicação do Ethrel® 720, pois o efeito benéfico na maturação só é observado quando os frutos estão completamente granados. Aplicações antecipadas promovem a maturação da casca (exocarpo) e mucilagem (mesocarpo), mas o produto não age sobre o desenvolvimento e maturação da semente (endosperma/endocarpo). Além disso, o efeito de maturação é observado apenas quando pulverizado diretamente sobre o fruto, logo, cafeeiros enfolhados podem requerer maior quantidade de calda. (MONÁCO; SONDAHL, 1974).

Como o desenvolvimento dos frutos também é desuniforme numa mesma planta, existirá sempre intensidade variável de frutos verdes em diferentes estágios de desenvolvimento (RENA; BARROS, 2004; PEREIRA et al., 2005; DIAS, 2013). Esse é um dos maiores problemas quanto ao uso do Ethrel, já que a formulação do produto estimula a maturação independente do estágio de desenvolvimento. Alternativamente, o Mathury (Satis) é um maturador fisiológico desenvolvido para inibir a biossíntese do etileno. Sua efetividade consiste em retardar o amadurecimento, prolongando a fixação do fruto na planta através da diminuição da atividade da água e reduzindo a atividade microbiana. Desse modo, os frutos cereja da primeira florada são “forçados” a esperar o desenvolvimento dos frutos das floradas tardias (DIAS, 2013). O Mathury é produzido a base de acetato de potássio e o mecanismo de degradação do etileno por íons potássio consiste na oxidação do etileno formando acetaldeído que em seguida, é oxidado a ácido acético, resultando na formação de dióxido de carbono e moléculas de água. Nesse processo de oxidação do etileno, hidróxido de potássio e dióxido de manganês são produtos intermediários (SÁ et al. 2008; SORBENTSYSTEMS, 2020).

Do ponto de vista econômico e fisiológico o endosperma é a parte mais importante do fruto (GOULART et al., 2007) e a tecnologia do Mathury parece atender essa questão. Porém, comparado com o Ethrel, os estudos dos efeitos do Mathury ainda são controversos. Enquanto Barbosa et al (2012) verificou incremento de 22% de frutos cereja, Rodrigues (2015) relatou que a pulverização do Mathury não diferiu significativamente das testemunhas em nenhum estágio de maturação avaliado. No geral, o uso de reguladores para controlar a maturação dos frutos é uma medida paliativa e que não pode ser generalizada porque a aplicação dos reguladores, especialmente o Ethrel, requer uma análise específica da lavoura considerando o número de floradas, espaçamento e manejo.

Nessa lógica, o florescimento sequencial do cafeeiro promovido pela ausência de sincronização no desenvolvimento dos botões florais é a principal causa para produção de frutos em diferentes estádios de maturação (FREITAS, 2013; DIAS, 2013; BARROS et al., 1978). Guerra et al. (2005) comprovaram que a florada única e uniforme, resultante da sincronização dos botões florais em cafeeiros reirrigados após um período de déficit hídrico, aumentou em 30% a produção de frutos cereja. Esses dados reforçam que a uniformidade de floração é o ponto chave para garantir a eficiência da colheita e a qualidade da xícara. Mas, para obter sucesso no controle do florescimento é fundamental obter domínio sobre os processos fisiológicos que acontecem durante o desenvolvimento floral do cafeeiro e o conhecimento aprofundado dos fatores vinculados ao desenvolvimento reprodutivo dessa espécie ainda são incipientes.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O desenvolvimento de pesquisas direcionadas à elucidação dos possíveis mecanismos que controlam o florescimento no cafeeiro é de suma importância para a adoção de práticas aliadas ao manejo adequado da lavoura de café. Ainda existem muitas lacunas sobre os processos fisiológicos que ocorrem durante o desenvolvimento reprodutivo dessa espécie, especialmente quanto a influência do balanço hormonal no florescimento. Estudos para comprovar a conexão entre esses eventos são necessários, tornando-se imprescindível identificar o papel do etileno e do 1-MCP nos mecanismos regulatórios da antese do cafeeiro.

REFERÊNCIAS

- Abeles, F. B.; Morgan, P. W.; Saltveit, J.R. **Ethylene in plant biology**. 2. ed. London: **Academic press.**, 414p., 1992.
- Achard, P., Baghour, M., Chapple, A., Hedden, P., Van Der Straeten, D., Genschik, P., Moritz, T., Harberd, N. P.. The plant stress hormone ethylene controls floral transition via DELLA-dependent regulation of floral meristem-identity genes. **Proc Natl Acad Sci USA** 104:6484–6489, 2007.
- Abeles, F. B., & Morgan, P. W. (1992). Front Matter. *Ethylene in Plant Biology*, iii. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-091628-6.50001-1>
- Abiri, R., Shaharuddin, N. A., Maziah, M., Yusof, Z. N. B., Atabaki, N., Sahebi, M., ... Hanafi, M. M. (2017, February 1). Role of ethylene and the APETALA 2/ethylene response factor superfamily in rice under various abiotic and biotic stress conditions. *Environmental and Experimental Botany*, Vol. 134, pp. 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.10.015>
- Adams, D. O., & Yang, S. F. (1979). Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(1), 170–174. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.1.170>
- Adams, D O, Yang, S. F., & Stumpf, P. K. (1979). *Communicated by* (Vol. 76).
- Adams, Douglas O, Shang, A., & Yang, F. A. (1977). Methionine Metabolism in Apple Tissue IMPLICATION OF S-ADENOSYLMETHIONINE AS AN INTERMEDIATE IN THE CONVERSION OF METHIONINE TO ETHYLENE'. In *Plant Physiol* (Vol. 60). Retrieved from www.plantphysiol.org
- Adams, Douglas O., & Yang, S. F. (1981). Ethylene the gaseous plant hormone: mechanism and regulation of biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. 6, pp. 161–164. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(81\)90059-1](https://doi.org/10.1016/0968-0004(81)90059-1)
- Agrônomo, E. (1997). *DAS VARIEDADES CATURRA E MUNDO NOVO DE EM DO DE PLANTAS POR COVA E DAS PLANTAS. DE BARROS.*
- Albacete, A. A., Martínez-Andújar, C., & Pérez-Alfocea, F. (2014, January). Hormonal and metabolic regulation of source-sink relations under salinity and drought: From plant survival to crop yield stability. *Biotechnology Advances*, Vol. 32, pp. 12–30. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.005>
- Alonso, J. M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S., & Ecker, J. R. (1999). EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. *Science*, 284(5423), 2148–2152. <https://doi.org/10.1126/science.284.5423.2148>
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Solano, R., Wisman, E., Ferrari, S., Ausubel, F. M., & Ecker, J. R. (2003). Five components of the ethylene-response pathway identified in a screen for weak ethylene-insensitive mutants in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), 2992–2997. <https://doi.org/10.1073/pnas.0438070100>
- An, F., Zhao, Q., Ji, Y., Li, W., Jiang, Z., Yu, X., ... Guo, H. (2010). Ethylene-induced stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 is mediated by proteasomal

degradation of EIN3 binding F-box 1 and 2 that requires EIN2 in arabidopsis. *Plant Cell*, 22(7), 2384–2401. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.076588>

Andersson, J. O., & Andersson, S. G. E. (2001). Pseudogenes, Junk DNA, and the Dynamics of Rickettsia Genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 18(5), 829–839. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003864>

Argueso, C. T., Hansen, M., & Kieber, J. J. (2007, June). Regulation of ethylene biosynthesis. *Journal of Plant Growth Regulation*, Vol. 26, pp. 92–105. <https://doi.org/10.1007/s00344-007-0013-5>

Arraes, F. B. M., Beneventi, M. A., Lisei de Sa, M. E., Paixao, J. F. R., Albuquerque, E. V. S., Marin, S. R. R., ... Grossi-de-Sa, M. F. (2015). Implications of ethylene biosynthesis and signaling in soybean drought stress tolerance. *BMC Plant Biology*, 15(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0597-z>

Augusto, B., & Silva, O. (n.d.). *The biannuality of coffee culture and the economic result of storage Article in Custos e Agronegocio · July 2013 CITATIONS 0 READS 68*. Retrieved from www.custoseagronegocioonline.com.br

Balakirev, E. S., & Ayala, F. J. (2003). Pseudogenes: Are They “Junk” or Functional DNA? *Annual Review of Genetics*, 37(1), 123–151. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.040103.103949>

Barbosa, D., Mandioca, E., Barbosa, D. S. G., Ltda, B., Belan, L. L., Carvalho, E. G., ... Testemunha, M. (n.d.). *Efeito do mathury na uniformidade de maturação do cafeeiro em lavouras de cafeicultura de montanha. d.*

Barbosa Monteiro Arraes, F., Aparecida Beneventi, M., Eugenia Lisei de Sa, M., Felipe Roca Paixao, J., Valeria Saliba Albuquerque, E., Regina Rockenbach Marin, S., ... Fatima Grossi-de-Sa, M. (2015). *Implications of ethylene biosynthesis and signaling in soybean drought stress tolerance*. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0597-z>

Barry, C. S., Blume, B., Bouzayen, M., Cooper, W., Hamilton, A. J., & Grierson, D. (1996). Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. *The Plant Journal*, 9(4), 525–535. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.09040525.x>

Barry, C. S., & Giovannoni, J. J. (2006). Ripening in the tomato Green-ripe mutant is inhibited by ectopic expression of a protein that disrupts ethylene signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(20), 7923–7928. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602319103>

Basu, S., Ramegowda, V., Kumar, A., & Pereira, A. (2016). Plant adaptation to drought stress [version 1; referees: 3 approved]. *F1000Research*, Vol. 5. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.7678.1>

Beltrano, Ronco, & Montaldi. (1999). Drought Stress Syndrome in Wheat Is Provoked by Ethylene Evolution Imbalance and Reversed by Rewatering, Aminoethoxyvinylglycine, or Sodium Benzoate. *Journal of Plant Growth Regulation*, 18(2), 59–64. <https://doi.org/10.1007/pl00007049>

Bidonde, S., Ferrer, M. A., Zegzouti, H., Ramassamy, S., Latche, A., Pech, J.-C., ... Bouzayen, M. (1998). Expression and characterization of three tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase cDNAs in yeast. *European Journal of Biochemistry*, 253(1), 20–26.

<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2530020.x>

Binnie, J. E., & McManus, M. T. (2009). Characterization of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) oxidase multigene family of *Malus domestica* Borkh. *Phytochemistry*, *70*(3), 348–360. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.01.002>

Blankenship, S. M., & Dole, J. M. (2003, April 1). 1-Methylcyclopropene: A review. *Postharvest Biology and Technology*, Vol. 28, pp. 1–25. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00246-6](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00246-6)

Bleecker, A. B. (1999, July 1). Ethylene perception and signaling: An evolutionary perspective. *Trends in Plant Science*, Vol. 4, pp. 269–274. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(99\)01427-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01427-2)

Bleecker, A. B., Esch, J. J., Hall, A. E., Rodríguez, F. I., & Binder, B. M. (1998). The ethylene-receptor family from *Arabidopsis*: Structure and function. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *353*(1374), 1405–1412. <https://doi.org/10.1098/rstb.1998.0295>

Bleecker, A. B., & Kende, H. (2000a). Ethylene: A Gaseous Signal Molecule in Plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *16*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.1>

Bleecker, A. B., & Kende, H. (2000b). ETHYLENE: A Gaseous Signal Molecule in Plants. In *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* (Vol. 16). Retrieved from www.annualreviews.org

Boller, T., Herner, R. C., & Kende, H. (1979). Assay for and Enzymatic Formation of an Ethylene Precursor, 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid*. In *Planta* (Vol. 145).

Bouzayen, M., Latché, A., & Pech, J. C. (1990). Subcellular localization of the sites of conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid into ethylene in plant cells. *Planta*, *180*(2), 175–180. <https://doi.org/10.1007/BF00193992>

Bradford, K. J., & Trewavas, A. J. (1994). Sensitivity thresholds and variable time scales in plant hormone action. *Plant Physiology*, *105*(4), 1029–1036. <https://doi.org/10.1104/pp.105.4.1029>

Bradford, Kent J. (2008). Shang Fa Yang: Pioneer in plant ethylene biochemistry. *Plant Science*, *175*(1–2), 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.01.005>

Bradford, Kent J., & Yang, S. F. (1980). Xylem Transport of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid, an Ethylene Precursor, in Waterlogged Tomato Plants. *Plant Physiology*, *65*(2), 322–326. <https://doi.org/10.1104/pp.65.2.322>

Brisson, L., El Bakkali-Taheri, N., Giorgi, M., Fadel, A., Kaizer, J., Réglie, M., ... Simaan, A. J. (2012). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase: Insight into cofactor binding from experimental and theoretical studies. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *17*(6), 939–949. <https://doi.org/10.1007/s00775-012-0910-3>

Buer, C. S., Wasteneys, G. O., & Masle, J. (2003). Ethylene modulates root-wave responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *132*(2), 1085–1096. <https://doi.org/10.1104/pp.102.019182>

Burns, J. K. (2008). 1-Methylcyclopropene applications in preharvest systems: Focus on citrus. *HortScience*, *43*(1), 112–114. <https://doi.org/10.21273/hortsci.43.1.112>

Bürstenbinder, K., Waduware, I., Schoor, S., Moffatt, B. A., Wirtz, M., Minocha, S. C., ... Sauter, M. (2010). Inhibition of 5'-methylthioadenosine metabolism in the Yang cycle alters

- polyamine levels, and impairs seedling growth and reproduction in Arabidopsis. *The Plant Journal*, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04211.x>
- Cai, C., Chen, K. S., Xu, W. P., Zhang, W. S., Li, X., & Ferguson, I. (2006). Effect of 1-MCP on postharvest quality of loquat fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 40(2), 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.12.014>
- Campa, C., Ballester, J. F., Doubeau, S., Dussert, S., Hamon, S., & Noirot, M. (2004). Trigonelline and sucrose diversity in wild *Coffea* species. *Food Chemistry*, 88(1), 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.020>
- Cao, Y.-R., Chen, S.-Y., & Zhang, J.-S. (2008). Plant Signaling & Behavior Ethylene signaling regulates salt stress response. *Plant Signaling & Behavior*, 3(10), 761–763. <https://doi.org/10.4161/psb.3.10.5934>
- Çelikel, F. G., Dodge, L. L., & Reid, M. S. (2002). Efficacy of 1-MCP (1-methylcyclopropene) and Promalin for extending the post-harvest life of Oriental lilies (*Lilium* × “Mona Lisa” and ‘Stargazer’). *Scientia Horticulturae*, 93(2), 149–155. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(01\)00331-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(01)00331-4)
- Chae, H. S., Faure, F., & Kieber, J. J. (2003). The *eto1*, *eto2*, and *eto3* mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in Arabidopsis by increasing the stability of ACS protein. *Plant Cell*, 15(2), 545–559. <https://doi.org/10.1105/tpc.006882>
- Chalfun Júnior, A., & Horllys Gomes Barreto Coorientador, O. (n.d.). *CARLOS HENRIQUE CARDON IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO FLOWERING LOCUS T (FT) E SUA EXPRESSÃO GÊNICA EM DIFERENTES ESPÉCIES DO GÊNERO COFFEA*.
- Chang, C. (2016a). Q&A: How do plants respond to ethylene and what is its importance? *BMC Biology*, 14(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0230-0>
- Chang, C. (2016b). Q and A: How do plants respond to ethylene and what is its importance? *BMC Biology*, 14(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0230-0>
- Chang, C., & Bleecker, A. B. (2004). Ethylene biology. More than a gas. *Plant Physiology*, 136(2), 2895–2899. <https://doi.org/10.1104/pp.104.900122>
- Chang, C., Kwok, S. F., Bleecker, A. B., & Meyerowitz, E. M. (1993). Arabidopsis ethylene-response gene *ETR1*: Similarity of product to two-component regulators. *Science*, 262(5133), 539–544. <https://doi.org/10.1126/science.8211181>
- Chang, C., & Stadler, R. (2001). Ethylene hormone receptor action in Arabidopsis. *BioEssays*, 23(7), 619–627. <https://doi.org/10.1002/bies.1087>
- Chao, Q., Rothenberg, M., Solano, R., Roman, G., Terzaghi, W., & Ecker, J. R. (1997). Activation of the ethylene gas response pathway in arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell*, 89(7), 1133–1144. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80300-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80300-1)
- Chen, H., Sun, J., Li, S., Cui, Q., Zhang, H., Xin, F., ... Huang, S. (2016). An ACC Oxidase Gene Essential for Cucumber Carpel Development. *Molecular Plant*, 9(9), 1315–1327. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.06.018>
- Chen, T., Xu, Y., Wang, J., Wang, Z., Yang, J., & Zhang, J. (2013). Polyamines and ethylene interact in rice grains in response to soil droughting during grain filling. *Journal of Experimental Botany*, 64(8), 2523–2538. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert115>

- Chen, W., Yin, X., Wang, L., Tian, J., Yang, R., Liu, D., ... Gao, J. (2013). Involvement of rose aquaporin RhPIP1;1 in ethylene-regulated petal expansion through interaction with RhPIP2;1. *Plant Molecular Biology*, 83(3), 219–233. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0084-6>
- Cin, V. D., Rizzini, F. M., Botton, A., & Tonutti, P. (2006). *The ethylene biosynthetic and signal transduction pathways are differently affected by 1-MCP in apple and peach fruit*. 42, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.06.008>
- Clark, D. G., Gubrium, E. K., Barrett, J. E., Nell, T. A., & Klee, H. J. (1999). Root formation in ethylene-insensitive plants. *Plant Physiology*, 121(1), 53–59. <https://doi.org/10.1104/pp.121.1.53>
- Clifton, I. J., McDonough, M. A., Ehrismann, D., Kershaw, N. J., Granatino, N., & Schofield, C. J. (2006, April). Structural studies on 2-oxoglutarate oxygenases and related double-stranded β -helix fold proteins. *Journal of Inorganic Biochemistry*, Vol. 100, pp. 644–669. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.01.024>
- Clouse, R. M., & Carraro, N. (2014). A novel phylogeny and morphological reconstruction of the PIN genes and first phylogeny of the ACC-oxidases (ACOs). *Frontiers in Plant Science*, 5(JUN). <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00296>
- Conti, V., Mareri, L., Faleri, C., Nepi, M., Romi, M., Cai, G., & Cantini, C. (2019). Drought stress affects the response of italian local tomato (*solanum lycopersicum* L.) varieties in a genotype-dependent manner. *Plants*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/plants8090336>
- Crisosto, C. H., Grantz, D. A., & Meinzer, F. C. (1992). Effects of water deficit on flower opening in coffee (*Coffea arabica* L.). *Tree Physiology*, 10(2), 127–139. <https://doi.org/10.1093/treephys/10.2.127>
- DaMatta, F. M., Cunha, R. L., Antunes, W. C., Martins, S. C. V., Araujo, W. L., Fernie, A. R., & Moraes, G. A. B. K. (2008). In field-grown coffee trees source–sink manipulation alters photosynthetic rates, independently of carbon metabolism, via alterations in stomatal function. *New Phytologist*, 178(2), 348–357. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02367.x>
- Dawood, T., Yang, X., Visser, E. J. W., Te Beek, T. A. H., Kensche, P. R., Cristescu, S. M., ... Rieu, I. (2016). A co-opted hormonal cascade activates dormant adventitious root primordia upon flooding in *solanum dulcamara*. *Plant Physiology*, 170(4), 2351–2364. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00773>
- De Camargo, Â. P., & De Camargo, M. B. P. (2001). Definição e Esquematização das Fases Fenológicas do Cafeeiro Arábica nas Condições Tropicais do Brasil. *Bragantia*, 60(1), 65–68.
- De Oliveira, E., Da Silva, F. M., Salvador, N., De Souza, Z. M., Chalfoun, S. M., & De Figueiredo, C. A. P. (2007). Custos operacionais da colheita mecanizada do cafeeiro. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 42(6), 827–831. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2007000600009>
- de Oliveira, R. R., Cesarino, I., Mazzafera, P., & Dornelas, M. C. (2014). Flower development in *Coffea arabica* L.: New insights into MADS-box genes. *Plant Reproduction*, 27(2), 79–94. <https://doi.org/10.1007/s00497-014-0242-2>
- Deikman, J. (1997). Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene transcription. *Physiologia Plantarum*, 100(3), 561–566. <https://doi.org/10.1111/j.1399->

3054.1997.tb03061.x

Demirevska, K., Zasheva, D., Dimitrov, R., Simova-Stoilova, L., Stamenova, M., & Feller, U. (2009). Drought stress effects on Rubisco in wheat: Changes in the Rubisco large subunit. *Acta Physiologiae Plantarum*, *31*(6), 1129–1138. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0331-2>

Depaepe, T., & Van Der Straeten, D. (2019). Tools of the Ethylene Trade: A Chemical Kit to Influence Ethylene Responses in Plants and Its Use in Agriculture. *Small Methods*, 1900267. <https://doi.org/10.1002/smt.201900267>

Depuydt, S., & Hardtke, C. S. (2011, May 10). Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Current Biology*, Vol. 21. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.03.013>

Dilley, D. R., Wang, Z., Kadirjan-Kalbach, D. K., Ververidis, F., Beaudrought, R., & Padmanabhan, K. (2013). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase reaction mechanism and putative post-translational activities of the ACCO protein. *AoB PLANTS*, *5*. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plt031>

Ditta, G., Pinyopich, A., Robles, P., Pelaz, S., & Yanofsky, M. F. (2004). The SEP4 gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. *Current Biology*, *14*(21), 1935–1940. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.10.028>

Du, H., Wu, N., Cui, F., You, L., Li, X., & Xiong, L. (2014). A homolog of *ETHYLENE OVERPRODUCER*, *O*s *ETOL* 1, differentially modulates drought and submergence tolerance in rice. *The Plant Journal*, *78*(5), 834–849. <https://doi.org/10.1111/tpj.12508>

Dubois, M., Van den Broeck, L., & Inzé, D. (2018, April 1). The Pivotal Role of Ethylene in Plant Growth. *Trends in Plant Science*, Vol. 23, pp. 311–323. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.01.003>

Dubouzet, J. G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E. G., Miura, S., ... Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant Journal*, *33*(4), 751–763. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01661.x>

Dugardeyn, J., Vandenbussche, F., & Van Der Straeten, D. (2007). To grow or not to grow: what can we learn on ethylene-gibberellin cross-talk by in silico gene expression analysis? *Journal of Experimental Botany*, *59*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm349>

El-Sharkawy, I., Kim, W. S., Jayasankar, S., Svircev, A. M., & Brown, D. C. W. (2008). Differential regulation of four members of the ACC synthase gene family in plum. *Journal of Experimental Botany*, *59*(8), 2009–2027. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern056>

Elias, R., & Almeida, B. (2013). *Influência Do Uso Do Inibidor De Café Lavras - Mg.*

Ella, L., Zion, A., Nehemia, A., & Amnon, L. (2003). Effect of the ethylene action inhibitor 1-methylcyclopropene on parsley leaf senescence and ethylene biosynthesis. *Postharvest Biology and Technology*, *30*(1), 67–74. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(03\)00080-2](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(03)00080-2)

English, P. J., Lycett, G. W., Roberts, J. A., & Jackson, M. B. (1995). Increased 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase activity in shoots of flooded tomato plants raises ethylene production to physiologically active levels. *Plant Physiology*, *109*(4), 1435–1440. <https://doi.org/10.1104/pp.109.4.1435>

Eum, H. L., Kim, H. B., Choi, S. B., & Lee, S. K. (2009). Regulation of ethylene biosynthesis

by nitric oxide in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit harvested at different ripening stages. *European Food Research and Technology*, 228(3), 331–338. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0938-3>

Fa Yang, S., & Hoffman, N. E. (1984). *ETHYLENE BIOSYNTHESIS AND ITS REGULATION IN HIGHER PLANTS*. Retrieved from www.annualreviews.org

Farrow, S. C., & Facchini, P. J. (2014, October 9). Functional diversity of 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenases in plant metabolism. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00524>

Felipe Alves Moreira Luiz Carlos Trugo, R., & Alberto Bastos De Maria, C. (2000). *COMPONENTES VOLÁTEIS DO CAFÉ TORRADO. PARTE II. COMPOSTOS ALIFÁTICOS, ALICÍCLICOS E AROMÁTICOS* (Vol. 23).

Feng, X., Apelbaum, A., Sisler, E. C., & Goren, R. (2004). Control of ethylene activity in various plant systems by structural analogues of 1-methylcyclopropene. *Plant Growth Regulation*, 42(1), 29–38. <https://doi.org/10.1023/B:GROW.0000014900.12351.4e>

Feng, Y., Xu, P., Li, B., Li, P., Wen, X., An, F., ... Guo, H. (2017). Ethylene promotes root hair growth through coordinated EIN3/EIL1 and RHD6/RSL1 activity in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(52), 13834–13839. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711723115>

Fernandes-Brum, C. N., Garcia, B. de O., Moreira, R. O., Ságio, S. A., Barreto, H. G., Lima, A. A., ... Chalfun-Júnior, A. (2017). A panel of the most suitable reference genes for RT-qPCR expression studies of coffee: screening their stability under different conditions. *Tree Genetics and Genomes*, 13(6), 131. <https://doi.org/10.1007/s11295-017-1213-1>

Ferreira De Mendonça, R., Rodrigues, W. N., Deleon Martins, L., & Tomaz, M. A. (n.d.). *ABORDAGEM SOBRE A BIENALIDADE DE PRODUÇÃO EM PLANTAS DE CAFÉ*.

Force, A., Lynch, M., Pickett, B., Amores, A., Yan, Y.-L., & Postlethwait, J. (1999). *Preservation of Duplicate Genes by Complementary, Degenerative Mutations*.

Forni, C., Duca, D., & Glick, B. R. (2017). Mechanisms of plant response to salt and drought stress and their alteration by rhizobacteria. *Plant and Soil*, 410(1–2), 335–356. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3007-x>

Franca, A. S., Mendonça, J. C. F., & Oliveira, S. D. (2005). Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. *LWT - Food Science and Technology*, 38(7), 709–715. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.08.014>

Franck, N., Vaast, P., Genard, M., & Dauszat, J. (2006). Soluble sugars mediate sink feedback down-regulation of leaf photosynthesis in field-grown *Coffea arabica*. *Tree Physiology*, 26(4), 517–525. <https://doi.org/10.1093/treephys/26.4.517>

Fujimoto, S. Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H., & Ohme-Takagi, M. (2000). Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell*, 12(3), 393–404. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.3.393>

Galati, V. C., Muniz, A. C. C., Guimarães, J. E. R., Inestroza-Lizardo, C. O., Mattiuz, C. M. F., & Mattiuz, B. H. (2017). Conservação pós-colheita de alstroéméria ‘ajax’ com uso de 1-metilciclopropeno. *Ciencia e Agrotecnologia*, 41(2), 181–190. <https://doi.org/10.1590/1413-70542017412032816>

- Gallie, D. R., & Young, T. E. (2004). The ethylene biosynthetic and perception machinery is differentially expressed during endosperm and embryo development in maize. *Molecular Genetics and Genomics*, 271(3), 267–281. <https://doi.org/10.1007/s00438-004-0977-9>
- Gao, Z., Chen, Y.-F., Randlett, M. D., Zhao, X.-C., Findell, J. L., Kieber, J. J., & Schaller, G. E. (2003). *Localization of the Raf-like Kinase CTR1 to the Endoplasmic Reticulum of Arabidopsis through Participation in Ethylene Receptor Signaling Complexes**. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305548200>
- Gehl, C., Jowkar, M. M., Wagenhaus, J., & Serek, M. (2019). Application of 1-MCP as a liquid formulation prevents ethylene-induced senescence in *Phalaenopsis* orchid flowers and *Kalanchoë blossfeldiana* inflorescences. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 94(4), 499–506. <https://doi.org/10.1080/14620316.2018.1563510>
- Geisler-Lee, J., Caldwell, C., & Gallie, D. R. (2010). Expression of the ethylene biosynthetic machinery in maize roots is regulated in response to hypoxia. *Journal of Experimental Botany*, 61(3), 857–871. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp362>
- Gertman, E., & Fuchs, Y. (1972). Effect of Abscisic Acid and Its Interactions with Other Plant Hormones on Ethylene Production in Two Plant Systems. *Plant Physiology*, 50(1), 194–195. <https://doi.org/10.1104/pp.50.1.194>
- Golding, J. B., Shearer, D., Wyllie, S. G., & McGlasson, W. B. (1998). Application of 1-MCP and propylene to identify ethylene-dependent ripening processes in mature banana fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 14(1), 87–98. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(98\)00032-5](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(98)00032-5)
- Gómez-Cadenas, A., Tadeo, F. R., Talon, M., & Primo-Millo, E. (1996). Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of Cleopatra mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant Physiology*, 112(1), 401–408. <https://doi.org/10.1104/pp.112.1.401>
- Gómez-Lim, M. A., Valdés-López, V., Cruz-Hernandez, A., & Saucedo-Arias, L. J. (1993). Isolation and characterization of a gene involved in ethylene biosynthesis from *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 134(2), 217–221. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90096-L](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90096-L)
- Gouveia, N. M. (1984). *Estudo da diferenciação de crescimento de gemas florais de coffea arabica L.: Observações sobre antese e maturação dos frutos* (p. 237). p. 237.
- Graham, L. E., Schippers, J. H. M., Dijkwel, P. P., & Wagstaff, C. (2018). Ethylene and Senescence Processes. In *Annual Plant Reviews online* (pp. 305–341). <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0484>
- Gray, W. M. (2004, September). Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biology*, Vol. 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020311>
- Grbic, V., & Bleecker, A. B. (1995). Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 8(4), 595–602. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1995.8040595.x>
- Guan, R., Zhao, Y., Zhang, H., Fan, G., Liu, X., Zhou, W., ... Chen, W. (2016). Draft genome of the living fossil *Ginkgo biloba*. *GigaScience*, 5(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s13742-016-0154-1>
- Guerra, A., Rocha, O., Rodrigues, G., Sanzonowicz, C., Sampaio, J., Silva, H., & Araújo, M. (2005). *Irrigação do cafeeiro no cerrado: estratégia de manejo de água para uniformização*

de florada.

Guillén, F., Castillo, S., Zapata, P. J., Martínez-Romero, D., Serrano, M., & Valero, D. (2007). Efficacy of 1-MCP treatment in tomato fruit. 1. Duration and concentration of 1-MCP treatment to gain an effective delay of postharvest ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 43(1), 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.07.004>

Guo, H., & Ecker, J. R. (2004). The ethylene signaling pathway: New insights. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol. 7, pp. 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2003.11.011>

Ha, S. T. T., Lim, J. H., & In, B. C. (2019). Simultaneous Inhibition of Ethylene Biosynthesis and Binding Using AVG and 1-MCP in Two Rose Cultivars with Different Sensitivities to Ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation*. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09999-6>

Habben, J. E., Bao, X., Bate, N. J., DeBruin, J. L., Dolan, D., Hasegawa, D., ... Schussler, J. R. (2014). Transgenic alteration of ethylene biosynthesis increases grain yield in maize under field drought-stress conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 12(6), 685–693. <https://doi.org/10.1111/pbi.12172>

Hahn, A., Zimmermann, R., Wanke, D., Harter, K., & Edelmann, H. G. (2008). The root cap determines ethylene-dependent growth and development in maize roots. *Molecular Plant*, 1(2), 359–367. <https://doi.org/10.1093/mp/ssm027>

Hall, A. E., Findell, J. L., Schaller, G. E., Sisler, E. C., & Bleecker, A. B. (2000). *Ethylene Perception by the ERS1 Protein in Arabidopsis I*. Retrieved from www.plantphysiol.org

Hall, B. P., Shakeel, S. N., & Schaller, G. E. (2007, June). Ethylene receptors: Ethylene perception and signal transduction. *Journal of Plant Growth Regulation*, Vol. 26, pp. 118–130. <https://doi.org/10.1007/s00344-007-9000-0>

Hamilton, A. J., Lycett, G. W., & Grierson, D. (1990). Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature*, 346(6281), 284–287. <https://doi.org/10.1038/346284a0>

Hartman, S., Sasidharan, R., & Voeselek, L. A. C. J. (2020). The role of ethylene in metabolic acclimations to low oxygen. *New Phytologist*, nph.16378. <https://doi.org/10.1111/nph.16378>

Hausinger, R. P. (2004, January). Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 39, pp. 21–68. <https://doi.org/10.1080/10409230490440541>

He, C., Thomas, A. M., Galimova, G. R., Mebel, A. M., & Kaiser, R. I. (2019). Gas-Phase Formation of 1-Methylcyclopropene and 3-Methylcyclopropene via the Reaction of the Methylidyne Radical (CH; X2II) with Propylene (CH₃CHCH₂; X1A'). *Journal of Physical Chemistry A*. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.9b09815>

Hegg, E. L., & Jr, L. Q. (1997). The 2-His-1-Carboxylate Facial Triad - An Emerging Structural Motif in Mononuclear Non-Heme Iron(II) Enzymes. *European Journal of Biochemistry*, 250(3), 625–629. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00625.x>

Hou, J. Y., Lin, W. L., Lee, N., & Alex Chang, Y. C. (2012). The residual effect of 1-methylcyclopropene on protecting phalaenopsis flowers against ethylene injury. *HortScience*, 47(10), 1484–1489. <https://doi.org/10.21273/hortsci.47.10.1484>

Houben, M., & Van de Poel, B. (2019, May 31). 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid

oxidase (ACO): The enzyme that makes the plant hormone ethylene. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00695>

Hu, Z., Huang, X., Amombo, E., Liu, A., Fan, J., Bi, A., ... Fu, J. (2020). The ethylene responsive factor CdERF1 from bermudagrass (*Cynodon dactylon*) positively regulates cold tolerance. *Plant Science*, 294, 110432. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110432>

Hua, J., & Meyerowitz, E. M. (1998). Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 94(2), 261–271. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81425-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81425-7)

Huang, P. Y., Catinot, J., & Zimmerli, L. (2016). Ethylene response factors in *Arabidopsis* immunity. *Journal of Experimental Botany*, 67(5), 1231–1241. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv518>

Huang, Y., Li, H., Hutchison, C. E., Laskey, J., & Kieber, J. J. (2003). Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 33(2), 221–233. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01620.x>

Hyun, S. C., & Kieber, J. J. (2005, June). Eto Brute? Role of ACS turnover in regulating ethylene biosynthesis. *Trends in Plant Science*, Vol. 10, pp. 291–296. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.04.006>

Inaba, A., Liu, X., Yokotani, N., Yamane, M., Lu, W. J., Nakano, R., & Kubo, Y. (2007). Differential feedback regulation of ethylene biosynthesis in pulp and peel tissues of banana fruit. *Journal of Experimental Botany*, 58(5), 1047–1057. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl265>

Iwai, T., Miyasaka, A., Seo, S., & Ohashi, Y. (2006). Contribution of ethylene biosynthesis for resistance to blast fungus infection in young rice plants. *Plant Physiology*, 142(3), 1202–1215. <https://doi.org/10.1104/pp.106.085258>

Jacq, C., Miller, J. R., & Brownlee, G. G. (1977). A pseudogene structure in 5S DNA of *Xenopus laevis*. *Cell*, 12(1), 109–120. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90189-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90189-1)

Jeong, J., Huber, D. J., & Sargent, S. A. (2002). Influence of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on ripening and cell-wall matrix polysaccharides of avocado (*Persea americana*) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 25(3), 241–256. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(01\)00184-3](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00184-3)

John, P. (1997). Ethylene biosynthesis: The role of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase, and its possible evolutionary origin. *Physiologia Plantarum*, 100(3), 583–592. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb03064.x>

John, P., J.r., A., Miller, P., & Miller, A. J. (1985). Activity of the Ethylene-forming Enzyme Measured in vivo at Different Cell potentials. *Journal of Plant Physiology*, 121(5), 397–406. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(85\)80076-6](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(85)80076-6)

Joo, S., Liu, Y., Lueth, A., & Zhang, S. (2008). MAPK phosphorylation-induced stabilization of ACS6 protein is mediated by the non-catalytic C-terminal domain, which also contains the cis-determinant for rapid degradation by the 26S proteasome pathway. *The Plant Journal*, 54(1), 129–140. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03404.x>

Joshi, R., Wani, S. H., Singh, B., Bohra, A., Dar, Z. A., Lone, A. A., ... Singla-Pareek, S. L. (2016). Transcription factors and plants response to drought stress: Current understanding and future directions. *Frontiers in Plant Science*, 7(2016JULY).

<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01029>

Ju, C., Yoon, G. M., Shemansky, J. M., Lin, D. Y., Ying, Z. I., Chang, J., ... Chang, C. (2012). CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(47), 19486–19491. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214848109>

Kaul, S., Koo, H. L., Jenkins, J., Rizzo, M., Rooney, T., Tallon, L. J., ... Somerville, C. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature*, *408*(6814), 796–815. <https://doi.org/10.1038/35048692>

Kawai, Y., Ono, E., & Mizutani, M. (2014). Evolution and diversity of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in plants. *The Plant Journal*, *78*(2), 328–343. <https://doi.org/10.1111/tpj.12479>

Kebenei, Z., Sisler, E. C., Winkelmann, T., & Serek, M. (2003). Efficacy of new inhibitors of ethylene perception in improvement of display life of kalanchoë (*Kalanchoë blossfeldiana* Poelln.) flowers. *Postharvest Biology and Technology*, *30*(2), 169–176. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(03\)00107-8](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(03)00107-8)

Kevany, B. M., Tieman, D. M., Taylor, M. G., Cin, V. D., & Klee, H. J. (2007). Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. *The Plant Journal*, *51*(3), 458–467. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03170.x>

Kieber, J. J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K. A., & Ecker, J. R. (1993). CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell*, *72*(3), 427–441. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90119-B](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90119-B)

Klee, H., & Tieman, D. (2002). The tomato ethylene receptor gene family: Form and function. *Physiologia Plantarum*, Vol. 115, pp. 336–341. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1150302.x>

Koch, G., Rolland, G., Dauzat, M., Bédier, A., Baldazzi, V., Bertin, N., ... Granier, C. (2019). Leaf production and expansion: A generalized response to drought stresses from cells to whole leaf biomass—a case study in the tomato compound leaf. *Plants*, *8*(10). <https://doi.org/10.3390/plants8100409>

Kohli, A., Sreenivasulu, N., Lakshmanan, P., & Kumar, P. P. (2013). The phytohormone crosstalk paradigm takes center stage in understanding how plants respond to abiotic stresses. *Plant Cell Reports*, *32*(7), 945–957. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1461-y>

Kuroha, T., Nagai, K., Gamuyao, R., Wang, D. R., Furuta, T., Nakamori, M., ... Ashikari, M. (2018). Ethylene-gibberellin signaling underlies adaptation of rice to periodic flooding. *Science*, *361*(6398), 181–186. <https://doi.org/10.1126/science.aat1577>

L-C Wang, K., Li, H., & Ecker, J. R. (2002). *Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks*. <https://doi.org/10.1105/tpc.001768>

Lacey, R. F., & Binder, B. M. (2014a). How plants sense ethylene gas - The ethylene receptors. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *133*, 58–62. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.01.006>

Lacey, R. F., & Binder, B. M. (2014b). How plants sense ethylene gas - The ethylene receptors. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *133*, 58–62.

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.01.006>

- Larrainzar, E., Molenaar, J. A., Wienkoop, S., Gil-Quintana, E., Alibert, B., Limami, A. M., ... González, E. M. (2014). Drought stress provokes the down-regulation of methionine and ethylene biosynthesis pathways in *Medicago truncatula* roots and nodules. *Plant, Cell and Environment*, *37*(9), 2051–2063. <https://doi.org/10.1111/pce.12285>
- Lasserre, E., Bouquin, T., Hernandez, J. A., Pech, J.-C., Balagué, C., & Bull, J. (1996). Structure and expression of three genes encoding ACC oxidase homologs from melon (*Cucumis melo* L.). *MGG Molecular & General Genetics*, *251*(1), 81–90. <https://doi.org/10.1007/bf02174348>
- Lee, H. Y., Chen, Y.-C., Kieber, J. J., & Yoon, G. M. (2017). Regulation of the turnover of ACC synthases by phytohormones and heterodimerization in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *91*(3), 491–504. <https://doi.org/10.1111/tpj.13585>
- Lee, H. Y., & Yoon, G. M. (2018). Regulation of ethylene biosynthesis by phytohormones in etiolated rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Molecules and Cells*, *41*(4), 311–319. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.2224>
- Leite, E. J., Marcelo, M., Paes De Camargo José, B., Macedo, R., Roberto, P., Thomaziello, A., ... Ferreira, A. (2004). *Fenologia do Cafeeiro: Condições Agrometeorológicas e Balanço Hídrico do Ano Agrícola Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Café Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*. Retrieved from www.embrapa.br/cafe
- Lestari, R., Rio, M., Martin, F., Leclercq, J., Woraathasin, N., Roques, S., ... Montoro, P. (2018). Overexpression of *Hevea brasiliensis* ethylene response factor *HbERF-IXc5* enhances growth and tolerance to abiotic stress and affects laticifer differentiation. *Plant Biotechnology Journal*, *16*(1), 322–336. <https://doi.org/10.1111/pbi.12774>
- Li, Y., Zhu, B., Xu, W., Zhu, H., Chen, A., Xie, Y., ... Luo, Y. (2007). LeERF1 positively modulated ethylene triple response on etiolated seedling, plant development and fruit ripening and softening in tomato. *Plant Cell Reports*, *26*(11), 1999–2008. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0394-8>
- Liang, X., Abel, S., Keller, J. A., Shen, N. F., & Theologis, A. (1992). *The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of Arabidopsis thaliana (ethylene biosynthesis/gene regulation/auxin/cycloheximide/gene evolution)* (Vol. 89).
- Lieberman, M., Kunishi, A., Mapson, L., & Wardale, D. (1965). Ethylene production from methionine. *Biochemical Journal*, *97*(2), 449–459. <https://doi.org/10.1042/bj0970449>
- Lieberman, Morris, Kunishi, A., Mapson, L. W., & Wardale, D. A. (1966). Stimulation of Ethylene Production in Apple Tissue Slices by Methionine. *Plant Physiology*, *41*(3), 376–382. <https://doi.org/10.1104/pp.41.3.376>
- LIMA, A. A. (2015). Ethylene regulation under different watering conditions and its possible involvement in coffee (*Coffea arabica* L.) flowering. *Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras*, 151.
- Lima, A., Sággio, S., Chalfun-Júnior, A., & Paiva, L. (2011). In silico characterization of putative members of the coffee (*Coffea arabica*) ethylene signaling pathway. *Genetics and Molecular Research*, *10*(2), 1277–1289. <https://doi.org/10.4238/vol10-2gmr1314>
- Lin, Z., Zhong, S., & Grierson, D. (2009). Recent advances in ethylene research. *Journal of Experimental Botany*, *60*(12), 3311–3336. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp204>

- Linkies, A., Müller, K., Morris, K., Turečková, V., Wenk, M., Cadman, C. S. C., ... Leubner-Metzger, G. (2009). Ethylene interacts with abscisic acid to regulate endosperm rupture during germination: A comparative approach using *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, *21*(12), 3803–3822. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.070201>
- Liu, D., Liu, X., Meng, Y., Sun, C., Tang, H., Jiang, Y., ... Gao, J. (2013). An organ-specific role for ethylene in rose petal expansion during dehydration and rehydration. *Journal of Experimental Botany*, *64*(8), 2333–2344. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert092>
- Liu, M., Diretto, G., Pirrello, J., Roustan, J. P., Li, Z., Giuliano, G., ... Bouzayen, M. (2014). The chimeric repressor version of an Ethylene Response Factor (ERF) family member, Sl-ERF.B3, shows contrasting effects on tomato fruit ripening. *New Phytologist*, *203*(1), 206–218. <https://doi.org/10.1111/nph.12771>
- Liu, M., Pirrello, J., Chervin, C., Roustan, J.-P., & Bouzayen, M. (2015). *Update on Ethylene Control of Fruit Ripening Ethylene Control of Fruit Ripening: Revisiting the Complex Network of Transcriptional Regulation 1*. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01361>
- Liu, Y., & Zhang, S. (2004). Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in arabidopsis. *Plant Cell*, *16*(12), 3386–3399. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.026609>
- Love, J., Bjorklund, S., Vahala, J., Hertzberg, M., Kangasjarvi, J., & Sundberg, B. (2009). Ethylene is an endogenous stimulator of cell division in the cambial meristem of *Populus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(14), 5984–5989. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811660106>
- Ma, B., Cui, M. L., Sun, H. J., Takada, K., Mori, H., Kamada, H., & Ezura, H. (2006). Subcellular localization and membrane topology of the melon ethylene receptor CmERS1. *Plant Physiology*, *141*(2), 587–597. <https://doi.org/10.1104/pp.106.080523>
- Ma, N., Xue, J., Li, Y., Liu, X., Dai, F., Jia, W., ... Gao, J. (2008). Rh-PIP2;1, a rose aquaporin gene, is involved in ethylene-regulated petal expansion. *Plant Physiology*, *148*(2), 894–907. <https://doi.org/10.1104/pp.108.120154>
- Martin, M. N., & Saftner, R. A. (1995). Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid N-malnoyltransferase from tomato fruit. *Plant Physiology*, *108*(3), 1241–1249. <https://doi.org/10.1104/pp.108.3.1241>
- Martinez, S., & Hausinger, R. P. (2015, August 21). Catalytic mechanisms of Fe(II)- and 2-Oxoglutarate-dependent oxygenases. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 290, pp. 20702–20711. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.648691>
- Massolo, J. F., González Forte, L., Concellón, A., Viña, S. Z., & Vicente, A. R. (2019). Effects of ethylene and 1-MCP on quality maintenance of fresh cut celery. *Postharvest Biology and Technology*, *148*, 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.11.007>
- Meng, Y., Ma, N., Zhang, Q., You, Q., Li, N., Ali Khan, M., ... Gao, J. (2014). Precise spatio-temporal modulation of ACC synthase by MPK6 cascade mediates the response of rose flowers to rehydration. *The Plant Journal*, *79*(6), 941–950. <https://doi.org/10.1111/tpj.12594>
- Mirica, L. M., & Klinman, J. P. (2008). The nature of O₂ activation by the ethylene-forming enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(6), 1814–1819.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0711626105>

Miyazaki, J. H., & Yang, S. F. (1987). The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 69(2), 366–370. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1987.tb04302.x>

Mizukami, Y. (2001, December 1). A matter of size: Developmental control of organ size in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol. 4, pp. 533–539. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00212-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00212-0)

Morais, H., Caramori, P. H., Kogushi, M. S., & De Arruda Ribeiro, A. M. (2008). Escala fenológica detalhada da fase reprodutiva de coffea arabica. *Bragantia*, 67(1), 257–260. <https://doi.org/10.1590/s0006-87052008000100031>

Morris, D. A., & Larcombe, N. J. (1995). Phloem Transport and Conjugation of Foliar-Applied 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Journal of Plant Physiology*, 146(4), 429–436. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)82004-3](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)82004-3)

Moussatche, P., & Klee, H. J. (2004). *Autophosphorylation Activity of the Arabidopsis Ethylene Receptor Multigene Family**. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403100200>

Müller-Dieckmann, H. J., Grantz, A. A., & Kim, S. H. (1999). The structure of the signal receiver domain of the Arabidopsis thaliana ethylene receptor ETR1. *Structure*, 7(12), 1547–1556. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)88345-8](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)88345-8)

Mullins, E. D., McCollum, T. G., & McDonald, R. E. (2000). Consequences on ethylene metabolism of inactivating the ethylene receptor sites in diseased non-climacteric fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 19(2), 155–164. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00077-6](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00077-6)

Muñozmuñoz-Robredo, P., Rubio, P., Infante, R., Campos-Vargas, R., Manríquez, D., González-Agüero, M., & Defilippi, B. G. (2011). Ethylene biosynthesis in apricot: Identification of a ripening-related 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase (ACS) gene. *Postharvest Biology and Technology*, 63, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.09.001>

Murphy, L. J., Robertson, K. N., Harroun, S. G., Brosseau, C. L., Werner-Zwanziger, U., Moilanen, J., ... Clyburne, J. A. C. (2014). A simple complex on the verge of breakdown: Isolation of the elusive cyanofolate ion. *Science*, 344(6179), 75–78. <https://doi.org/10.1126/science.1250808>

Nakatsuka, A., Murachi, S., Okunishi, H., Shiomi, S., Nakano, R., Kubo, Y., & Inaba, A. (1998). Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiology*, 118(4), 1295–1305. <https://doi.org/10.1104/pp.118.4.1295>

Negi, S., Ivanchenko, M. G., & Muday, G. K. (2008). Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, 55(2), 175–187. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03495.x>

Nie, X., Singh, R. P., & Tai, G. C. C. (2002). Molecular characterization and expression analysis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homologs from potato under abiotic and biotic stresses. *Genome*, 45(5), 905–913. <https://doi.org/10.1139/g02-062>

- O'Donnell, P. J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H. M. O., & Bowles, D. J. (1996). Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science*, 274(5294), 1914–1917. <https://doi.org/10.1126/science.274.5294.1914>
- O'Malley, R. C., Rodriguez, F. I., Esch, J. J., Binder, B. M., O'Donnell, P., Klee, H. J., & Bleecker, A. B. (2005). Ethylene-binding activity, gene expression levels, and receptor system output for ethylene receptor family members from Arabidopsis and tomato†. *The Plant Journal*, 41(5), 651–659. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02331.x>
- Ohme-Takagi, M., & Shinshi, H. (1995). Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell*, 7(2), 173–182. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.2.173>
- Özkaya, O., Yildirim, D., Dündar, Ö., & Tükel, S. S. (2016). Effects of 1-methylcyclopropene (1-MCP) and modified atmosphere packaging on postharvest storage quality of nectarine fruit. *Scientia Horticulturae*, 198, 454–461. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.12.016>
- Paes, Â., Camargo, D. E., Bento, M., & De Camargo, P. (n.d.). *AGROMETEOROLOGIA DEFINIÇÃO E ESQUEMATIZAÇÃO DAS FASES FENOLÓGICAS DO CAFEIRO ARÁBICA NAS CONDIÇÕES TROPICAIS DO BRASIL (1)*.
- Pak Dek, M. S., Padmanabhan, P., Subramanian, J., & Paliyath, G. (2018). Inhibition of tomato fruit ripening by 1-MCP, wortmannin and hexanal is associated with a decrease in transcript levels of phospholipase D and other ripening related genes. *Postharvest Biology and Technology*, 140, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.02.009>
- Park, C. H., Roh, J., Youn, J. H., Son, S. H., Park, J. H., Kim, S. Y., ... Kim, S. K. (2018). Arabidopsis ACC oxidase 1 coordinated by multiple signals mediates ethylene biosynthesis and is involved in root development. *Molecules and Cells*, 41(10), 923–932. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.0092>
- Parkinson, C. L., Adams, K. L., & Palmer, J. D. (1999). Multigene analyses identify the three earliest lineages of extant flowering plants. *Current Biology*, 9(24), 1485–1491. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)80119-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)80119-0)
- Parreiras Pereira, S., Ferreira Bartholo, G., Pereira Baliza, D., Moreira Sobreira, F., & José Guimarães, R. (n.d.). Crescimento, produtividade e bienalidade do cafeeiro em função do espaçamento de cultivo. In *Pesq. agropec. bras* (Vol. 46).
- Paudel, J. R., & Bede, J. C. (2015). Ethylene Signaling Modulates Herbivore-Induced Defense Responses in the Model Legume *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(5), 569–579. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-14-0348-R>
- Pei, H., Ma, N., Tian, J., Luo, J., Chen, J., Li, J., ... Gao, J. (2013). An NAC transcription factor controls ethylene-regulated cell expansion in flower petals. *Plant Physiology*, 163(2), 775–791. <https://doi.org/10.1104/pp.113.223388>
- Peiser, G. D., Wang, T., Hoffman, N. E., Yang, S. F., Liut, H., WALSHt, C. T., & Stumpf, P. K. (1984). Formation of cyanide from carbon 1 of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid during its conversion to ethylene (f-cyanoalanine/cyanoformic acid/ethylene metabolism) Communicated by. In *Biochemistry* (Vol. 81).
- Pelaz, S., Ditta, G. S., Baumann, E., Wisman, E., & Yanofsky, M. F. (2000). B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature*, 405(6783), 200–203. <https://doi.org/10.1038/35012103>

- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 45e – 45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Picini, A. G., De Camargo, M. B. P., Ortolani, A. A., Fazuoli, L. C., & Gallo, P. B. (1999). Desenvolvimento e teste de modelos agrometeorológicos para a estimativa de produtividade do cafeeiro. *Bragantia*, 58(1), 157–170. <https://doi.org/10.1590/s0006-87051999000100015>
- Pierik, R., Sasidharan, R., & Voeselek, L. A. C. J. (2007, June 10). Growth control by ethylene: Adjusting phenotypes to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation*, Vol. 26, pp. 188–200. <https://doi.org/10.1007/s00344-006-0124-4>
- Pierik, R., Tholen, D., Poorter, H., Visser, E. J. W., & Voeselek, L. A. C. J. (2006). The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends in Plant Science*, 11(4), 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.02.006>
- Pimenta, C. J., & Vilela, E. R. (2003). Efeito do tipo e época de colheita na qualidade do café (*Coffea arabica* L.). *Acta Scientiarum. Agronomy*, 25(1), 131–136. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v25i1.2464>
- Pirrello, J., Prasad, B. C. N., Zhang, W., Chen, K., Mila, I., Zouine, M., ... Bouzayen, M. (2012). Functional analysis and binding affinity of tomato ethylene response factors provide insight on the molecular bases of plant differential responses to ethylene. *BMC Plant Biology*, 12, 190. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-190>
- Potuschak, T., Lechner, E., Parmentier, Y., Yanagisawa, S., Grava, S., Koncz, C., & Genschik, P. (2003). EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two Arabidopsis F box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell*, 115(6), 679–689. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00968-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00968-1)
- Protasio Pereira, L. F., Galvão, R. M., Kobayashi, A. K., Cação, S. M. B., & Esteves Vieira, L. G. (2005). Ethylene production and acc oxidase gene expression during fruit ripening of *Coffea arabica* L. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(3), 283–289. <https://doi.org/10.1590/s1677-04202005000300002>
- Qiao, H., Shen, Z., Huang, S. S. C., Schmitz, R. J., Urich, M. A., Briggs, S. P., & Ecker, J. R. (2012). Processing and subcellular trafficking of ER-tethered EIN2 control response to ethylene gas. *Science*, 338(6105), 390–393. <https://doi.org/10.1126/science.1225974>
- Qu, X., & Schaller, G. E. (2004). Requirement of the histidine kinase domain for signal transduction by the ethylene receptor ETR1. *Plant Physiology*, 136(2), 2961–2970. <https://doi.org/10.1104/pp.104.047126>
- Rena, A. B. (n.d.). *Floração Do Cafeeiro : Um Enigma*.
- Rickes, L. N., Klumb, E. K., Benitez, L. C., Braga, E. J. B., & Bianchi, V. J. (2019). Differential expression of the genes involved in responses to water-deficit stress in peach trees cv. Chimarrita grafted onto two different rootstocks. *Bragantia*, 78(1), 60–70. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.2017372>
- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C. Z., Keddie, J., ... Yu, G. L. (2000). Arabidopsis transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290(5499), 2105–2110. <https://doi.org/10.1126/science.290.5499.2105>
- Riov, J., Dagan, E., Goren, R., & Yang, S. F. (1990). Characterization of abscisic acid-induced ethylene production in citrus leaf and tomato fruit tissues. *Plant Physiology*, 92(1), 48–53. <https://doi.org/10.1104/pp.92.1.48>

- Robles, L., Stepanova, A., & Alonso, J. (2013). Molecular Mechanisms of Ethylene-Auxin Interaction. *Molecular Plant*, 6, 1734–1737. <https://doi.org/10.1093/mp/sst113>
- Rocha, O. C., Guerra, A. F., Rodrigues, G. C., Sanzonowicz, C., Silva, F. A. M. d., Ribeiro, L. F., & Toledo, P. M. dos R. (2007). *Manejo estratégico de irrigação para a cultura do café (Coffea arabica L.) no cerrado brasileiro*. <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/10820/1687>. Retrieved from http://hdl.handle.net/10820/1687%5Cnhttp://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/10820/1687/179995_Art112f.pdf?sequence=1
- Rocklin, A. M., Kato, K., Liu, H. W., Que, L., & Lipscomb, J. D. (2004). Mechanistic studies of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase: Single turnover reaction. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 9(2), 171–182. <https://doi.org/10.1007/s00775-003-0510-3>
- RODRIGUES, J. P. B. (2015). *Efeito Do Mathury™ E Ethephon Na Maturação Dos Frutos E Qualidade Da Bebida De Café*. Retrieved from <http://uenf.br/posgraduacao/producao-vegetal/wp-content/uploads/sites/10/2015/08/Dissertação-João-Paulo-Braga-Rodrigues.pdf>
- Rottmann, W. H., Peter, G. F., Oeller, P. W., Keller, J. A., Shen, N. F., Nagy, B. P., ... Theologis, A. (1991). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by a multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence. *Journal of Molecular Biology*, 222(4), 937–961. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90587-V](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90587-V)
- Ruduś, I., Sasiak, M., & Kepczyński, J. (2013). Regulation of ethylene biosynthesis at the level of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO) gene. *Acta Physiologiae Plantarum*, Vol. 35, pp. 295–307. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1096-6>
- Sá, C. R. L., Silva, E. O., Terao, D., & Saraiva, A. C. M. (2008). Métodos de Controle do Etileno na Qualidade e Conservação Pós-Colheita de Frutas. *Embrapa Agroindústria Tropical*, 36.
- Ságio, S. A., Barreto, H. G., Lima, A. A., Moreira, R. O., Rezende, P. M., Paiva, L. V., & Chalfun-Junior, A. (2014). Identification and expression analysis of ethylene biosynthesis and signaling genes provides insights into the early and late coffee cultivars ripening pathway. *Planta*, 239(5), 951–963. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2026-1>
- Sakai, H., Hua, J., Chen, Q. G., Chang, C., Medrano, L. J., Bleecker, A. B., & Meyerowitz, E. M. (1998). ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in Arabidopsis. In *Plant Biology* (Vol. 95). Retrieved from www.pnas.org.
- Saleh-Lakha, S., Grichko, V. P., Sisler, E. C., & Glick, B. R. (2004). The effect of the ethylene action inhibitor 1-cyclopropenylmethyl butyl ether on early plant growth. *Journal of Plant Growth Regulation*, 23(4), 307–312. <https://doi.org/10.1007/s00344-004-0011-9>
- Sangtarash, M. H., Qaderi, M. M., Chinnappa, C. C., & Reid, D. M. (2009). Differential sensitivity of canola (*Brassica napus*) seedlings to ultraviolet-B radiation, water stress and abscisic acid. *Environmental and Experimental Botany*, 66(2), 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.03.004>
- Santos, I. S. (2016). *Influência do etileno na regulação do florescimento de Coffea arabica L.*. *Dissertação: Universidade Federal De Lavras*.
- Sasidharan, R., & Voeselek, L. A. C. J. (1991). *Ethylene-Mediated Acclimations to Flooding Stress I*. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00387>
- Savada, R. P., Ozga, J. A., Jayasinghege, C. P. A., Waduthanthri, K. D., & Reinecke, D. M.

(2017). Heat stress differentially modifies ethylene biosynthesis and signaling in pea floral and fruit tissues. *Plant Molecular Biology*, 95(3), 313–331. <https://doi.org/10.1007/s11103-017-0653-1>

Schachtman, D. P., & Goodger, J. Q. D. (2008, June 1). Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends in Plant Science*, Vol. 13, pp. 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.04.003>

Schiefelbein, J. W. (2000). Constructing a plant cell. The genetic control of root hair development. *Plant Physiology*, 124(4), 1525–1531. <https://doi.org/10.1104/pp.124.4.1525>

Schroeder, J. I., Allen, G. J., Hugouvieux, V., Kwak, J. M., & Waner, D. (2001). GUARD CELL SIGNAL TRANSDUCTION. In *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* (Vol. 52). Retrieved from www.annualreviews.org

Sebastià, C. H., Hardin, S. C., Clouse, S. D., Kieber, J. J., & Huber, S. C. (2004). Identification of a new motif for CDPK phosphorylation in vitro that suggests ACC synthase may be a CDPK substrate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 428(1), 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.04.025>

Seki, M., Umezawa, T., Urano, K., & Shinozaki, K. (2007, June). Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol. 10, pp. 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.014>

Sell, S., & Hehl, R. (2005). A fifth member of the tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) oxidase gene family harbours a leucine zipper and is anaerobically induced. *DNA Sequence - Journal of DNA Sequencing and Mapping*, 16(1), 80–82. <https://doi.org/10.1080/10425170500050817>

Seo, Y. S., Yoo, A., Jung, J., Sung, S. K., Yang, D. R., Kim, W. T., & Lee, W. (2004). The active site and substrate-binding mode of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase determined by site-directed mutagenesis and comparative modelling studies. *Biochemical Journal*, 380(2), 339–346. <https://doi.org/10.1042/BJ20031762>

Serek, E. C. S. M. (1999). Compounds controlling the ethylene receptor. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*.

Serek, M., & Sisler, E. C. (2001). Efficacy of inhibitors of ethylene binding in improvement of the postharvest characteristics of potted flowering plants. *Postharvest Biology and Technology*, 23(2), 161–166. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(01\)00109-0](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00109-0)

Seymour, G. B., Chapman, N. H., Chew, B. L., & Rose, J. K. C. (2013, April). Regulation of ripening and opportunities for control in tomato and other fruits. *Plant Biotechnology Journal*, Vol. 11, pp. 269–278. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00738.x>

Shakeel, S. N., Wang, X., Binder, B. M., & Schaller, G. E. (2013). Mechanisms of signal transduction by ethylene: Overlapping and non-overlapping signalling roles in a receptor family. *AoB PLANTS*, Vol. 5. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plt010>

Sharp, R. E. (2002). Interaction with ethylene: Changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25(2), 211–222. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2002.00798.x>

Sharp, R. E., Wu, Y., Voetberg, G. S., Saab, I. N., & LeNoble, M. E. (1994). Confirmation that abscisic acid accumulation is required for maize primary root elongation at low water potentials. *Journal of Experimental Botany*, 45(Special_Issue), 1743–1751.

https://doi.org/10.1093/jxb/45.special_issue.1743

Shaw, J. F., Chou, Y. S., Chang, R. C., & Yang, S. F. (1996). Characterization of the ferrous ion binding sites of apple 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by site-directed mutagenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 225(3), 697–700. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1237>

Shi, L. S., & Liu, J. P. (2016). Molecular cloning and expression analysis of an 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene from *Oncidium Gower Ramsey*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 469(2), 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.11.107>

Shi, Y. H., Zhu, S. W., Mao, X. Z., Feng, J. X., Qin, Y. M., Zhang, L., ... Zhu, Y. X. (2006). Transcriptome profiling, molecular biological, and physiological studies reveal a major role for ethylene in cotton fiber cell elongation. *Plant Cell*, 18(3), 651–664. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.040303>

Shinohara, T., Martin, E. A., & Leskovar, D. I. (2017). Ethylene regulators influence germination and root growth of globe artichoke seedlings exposed to heat stress conditions. *Seed Science and Technology*, 45(1), 167–178. <https://doi.org/10.15258/sst.2017.45.1.07>

Siqueira, H. H. de, & Abreu, C. M. P. de. (2006). Composição físico-química e qualidade do café submetido a dois tipos de torração e com diferentes formas de processamento. *Ciência e Agrotecnologia*, 30(1), 112–117. <https://doi.org/10.1590/s1413-70542006000100016>

Sisler, E. C., & Serek, M. (1997a). Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. *Physiologia Plantarum*, 100(3), 577–582. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb03063.x>

Sisler, E. C., & Serek, M. (1997b). Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. *Physiologia Plantarum*, 100(3), 577–582. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1997.1000320.x>

Sisler, Edward C. (2006, July). The discovery and development of compounds counteracting ethylene at the receptor level. *Biotechnology Advances*, Vol. 24, pp. 357–367. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.01.002>

Sisler, Edward C., Alwan, T., Goren, R., Serek, M., & Apelbaum, A. (2003). 1-Substituted cyclopropenes: Effective blocking agents for ethylene action in plants. *Plant Growth Regulation*, 40(3), 223–228. <https://doi.org/10.1023/A:1025080420990>

Sisler, Edward C, Serek, M., Dupille, E., & Goren, R. (1999). Inhibition of ethylene responses by 1-Methylcyclopropene and 3-Methylcyclopropene. In *Plant Growth Regulation* (Vol. 27).

Soares, A. R., Mantovani, E. C., Rena, A. B., & Soares, A. A. (2005). Irrigação e fisiologia da floração em cafeeiros adultos na região da zona da mata de Minas Gerais. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 27(1), 117–125. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v27i1.2128>

Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q., & Ecker, J. R. (1998). Nuclear events in ethylene signaling: A transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes and Development*, 12(23), 3703–3714. <https://doi.org/10.1101/gad.12.23.3703>

Spollen, W. G., Lenoble, M. E., Samuels, T. D., Bernstein, N., & Sharp, R. E. (2000). Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant Physiology*, 122(3), 967–976.

<https://doi.org/10.1104/pp.122.3.967>

Staswick, P. E., & Tiryaki, I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugate it to isoleucine in Arabidopsis W inside box sign. *Plant Cell*, *16*(8), 2117–2127. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.023549>

Steibel, J. P., Poletto, R., Coussens, P. M., & Rosa, G. J. M. (2009). A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. *Genomics*, *94*(2), 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2009.04.008>

Stepanova, A. N., & Alonso, J. M. (2005). Ethylene signalling and response pathway: a unique signalling cascade with a multitude of inputs and outputs. *Physiologia Plantarum*, *123*(2), 195–206. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00447.x>

Subbiah, V., & Reddy, K. J. (2010). Interactions between ethylene, abscisic acid and cytokinin during germination and seedling establishment in Arabidopsis. *Journal of Biosciences*, *35*(3), 451–458. <https://doi.org/10.1007/s12038-010-0050-2>

Sun, Xiangzhong, Li, Y., He, W., Ji, C., Xia, P., Wang, Y., ... Guo, H. (2017). Pyrazinamide and derivatives block ethylene biosynthesis by inhibiting ACC oxidase. *Nature Communications*, *8*. <https://doi.org/10.1038/ncomms15758>

Sun, Xiaoming, Zhao, T., Gan, S., Ren, X., Fang, L., Karungo, S. K., ... Xin, H. (2016). Ethylene positively regulates cold tolerance in grapevine by modulating the expression of ETHYLENE RESPONSE FACTOR 057. *Scientific Reports*, *6*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep24066>

Sylvia, M., & Pirrung, M. C. (1996). *United States Patent (19)*. (19).

Tang, X., Wang, H., Brandt, A. S., & Woodson, W. R. (1993). Organization and structure of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family from *Petunia hybrida*. *Plant Molecular Biology*, *23*(6), 1151–1164. <https://doi.org/10.1007/BF00042349>

Tang, X., & Woodson, W. R. (1996). Temporal and spatial expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase mRNA following pollination of immature and mature petunia flowers. *Plant Physiology*, *112*(2), 503–511. <https://doi.org/10.1104/pp.112.2.503>

Tatsuki, M., & Mori, H. (2001). Phosphorylation of Tomato 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid Synthase, LE-ACS2, at the C-terminal Region. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(30), 28051–28057. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101543200>

Thongkum, M., Imsabai, W., Burns, P., McAtee, P. A., Schaffer, R. J., Allan, A. C., & Ketsa, S. (2018). The effect of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on expression of ethylene receptor genes in durian pulp during ripening. *Plant Physiology and Biochemistry*, *125*, 232–238. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.02.004>

Tian, M. S., Prakash, S., Elgar, H. J., Young, H., Burmeister, D. M., & Ross, G. S. (2000). Responses of strawberry fruit to 1-methylcyclopropene (1-MCP) and ethylene. *Plant Growth Regulation*, *32*(1), 83–90. <https://doi.org/10.1023/A:1006409719333>

Tieman, D M, Ciardi, J. A., Taylor, M. G., & Klee, H. J. (2001). Members of the tomato LeEIL (EIN3-like) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *26*(1), 47–58. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01006.x>

- Toivonen, P. M. A., & Lu, C. (2005). Studies on elevated temperature, short-term storage of “Sunrise” Summer apples using 1-MCP to maintain quality. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *80*(4), 439–446. <https://doi.org/10.1080/14620316.2005.11511957>
- Tombesi, S., Frioni, T., Poni, S., & Palliotti, A. (2018). Effect of water stress “memory” on plant behavior during subsequent drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, *150*, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.03.009>
- Trevenzoli Favero, B., Poimenopoulou, E., Himmelboe, M., Stergiou, T., Müller, R., & Lütken, H. (2016). Efficiency of 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatment after ethylene exposure of mini-Phalaenopsis. *Scientia Horticulturae*, *211*, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.08.010>
- Trivellini, A., Ferrante, A., Vernieri, P., & Serra, G. (2011). Effects of abscisic acid on ethylene biosynthesis and perception in *Hibiscus rosa-sinensis* L. flower development. *Journal of Experimental Botany*, *62*(15), 5437–5452. <https://doi.org/10.1093/jxb/err218>
- Tsuchisaka, A., & Theologis, A. (2004a). Unique and overlapping expression patterns among the Arabidopsis 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. *Plant Physiology*, *136*(2), 2982–3000. <https://doi.org/10.1104/pp.104.049999>
- Tsuchisaka, A., & Theologis, A. (2004b). Unique and overlapping expression patterns among the Arabidopsis 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. *Plant Physiology*, *136*(2), 2982–3000. <https://doi.org/10.1104/pp.104.049999>
- Tsuchisaka, A., Yu, G., Jin, H., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Zhang, X., ... Theologis, A. (2009). A combinatorial interplay among the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate isoforms regulates ethylene biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, *183*(3), 979–1003. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.107102>
- Tu, Y., He, B., Gao, S., Guo, D., Jia, X., Dong, X., & Guo, M. (2019). CTACO1 overexpression resulted in the alteration of the flavonoids profile of safflower. *Molecules*, *24*(6). <https://doi.org/10.3390/molecules24061128>
- Tucker, M. L., Xue, P., & Yang, R. (2010). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) concentration and ACC synthase expression in soybean roots, root tips, and soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*)-infected roots. *Journal of Experimental Botany*, *61*(2), 463–472. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp317>
- Tudela, D., & Primo-Millo, E. (1992). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid transported from roots to shoots promotes leaf abscission in cleopatra mandarin (*Citrus reshni* Hort, ex tan.) seedlings rehydrated after water stress. *Plant Physiology*, *100*(1), 131–137. <https://doi.org/10.1104/pp.100.1.131>
- Tutar, Y. (2012). Pseudogenes. *Comparative and Functional Genomics*, Vol. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/424526>
- Valadares, S. V., Neves, J. C. L., Rosa, G. N. G. P., Martinez, H. E. P., Venegas, V. H. A., & de Lima, P. C. (2013). Produtividade e bienalidade da produção de cafezais adensados, sob diferentes doses de N e K. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, *48*(3), 296–303. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000300008>
- Van de Poel, B., Vandenzavel, N., Smet, C., Nicolay, T., Bulens, I., Mellidou, I., ... Geeraerd, A. H. (2014). Tissue specific analysis reveals a differential organization and regulation of both ethylene biosynthesis and E8 during climacteric ripening of tomato. *BMC Plant Biology*,

14(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-11>

Van Der Straeten, D., Anuntalabhochai, S., Van Caeneghem, W., Zhou, Z., Gielen, J., & Van Montagu, M. (1997). Expression of three members of the ACC synthase gene family in deepwater rice by submergence, wounding and hormonal treatments. *Plant Science*, 124(1), 79–87. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(97\)04609-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(97)04609-8)

Van Der Straeten, D., Rodrigues-Pousada, R. A., Villarroel, R., Hanley, S., Goodmant, H. M., & Van Montagu, M. (1992). *Plant Biology Cloning, genetic mapping, and expression analysis of an Arabidopsis thaliana gene that encodes 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (development/ethylene/gene regulation/restriction fragment length polymorphism mapping/stress)* (Vol. 89).

van Es, S. W., Silveira, S. R., Rocha, D. I., Bimbo, A., Martinelli, A. P., Dornelas, M. C., ... Immink, R. G. H. (2018). Novel functions of the Arabidopsis transcription factor TCP5 in petal development and ethylene biosynthesis. *Plant Journal*, 94(5), 867–879. <https://doi.org/10.1111/tbj.13904>

Vanderstraeten, L., & van Der Straeten, D. (2017, January 24). Accumulation and transport of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: Current status, considerations for future research and agronomic applications. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00038>

Vanin, E. F. (1985). PROCESSED PSEUDOGENES: CHARACTERISTICS AND EVOLUTION. In *Ann. Rev. Genet* (Vol. 19). Retrieved from www.annualreviews.org

Ververidis, P., & John, P. (1991). Complete recovery in vitro of ethylene-forming enzyme activity. *Phytochemistry*. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)85241-Q](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)85241-Q)

Villegente, M., Marmey, P., Job, C., Galland, M., Cueff, G., Godin, B., ... Job, D. (2017). A Combination of Histological, Physiological, and Proteomic Approaches Shed Light on Seed Desiccation Tolerance of the Basal Angiosperm *Amborella trichopoda*. *Proteomes*, 5(4), 19. <https://doi.org/10.3390/proteomes5030019>

Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R. K., ... Sharma, S. (2017, February 20). Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: A review on current knowledge and future prospects. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00161>

Vukašinović, N., Cvrčková, F., Eliáš, M., Cole, R., Fowler, J. E., Žárský, V., & Synek, L. (2014). Dissecting a hidden gene duplication: The arabidopsis thaliana SEC10 locus. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094077>

Wang, D., Fan, J., & Ranu, R. S. (2004). Cloning and expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase cDNA from *Rosa x hybrida*. *Plant Cell Reports*, 22(6), 422–429. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0721-7>

Wang, J. H., Gu, K. Di, Han, P. L., Yu, J. Q., Wang, C. K., Zhang, Q. Y., ... Hao, Y. J. (2020). Apple ethylene response factor MdERF11 confers resistance to fungal pathogen *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Science*, 291, 110351. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110351>

Wang, K. L. C., Yoshida, H., Lurin, C., & Ecker, J. R. (2004). Regulation of ethylene gas biosynthesis by the Arabidopsis ETO1 protein. *Nature*, 428(6986), 945–950. <https://doi.org/10.1038/nature02516>

- Wang, P., Moore, B. M., Panchy, N. L., Meng, F., Lehti-Shiu, M. D., & Shiu, S. H. (2018). Factors influencing gene family size variation among related species in a plant family, solanaceae. *Genome Biology and Evolution*, *10*(10), 2596–2613. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy193>
- Wang, W., Hall, A. E., O'Malley, R., & Bleecker, A. B. (2003). Canonical histidine kinase activity of the transmitter domain of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis* is not required for signal transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(1), 352–357. <https://doi.org/10.1073/pnas.0237085100>
- Wani, S. H., Kumar, V., Shriram, V., & Sah, S. K. (2016, June 1). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *Crop Journal*, Vol. 4, pp. 162–176. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2016.01.010>
- Watkins, C B. (2008). *POSTHARVEST RIPENING REGULATION AND INNOVATION IN STORAGE TECHNOLOGY* | *International Society for Horticultural Science*. 2, 51–58. Retrieved from http://www.ishs.org/ishs-article/796_4
- Watkins, Chris B. (2006, July). The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnology Advances*, Vol. 24, pp. 389–409. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.01.005>
- Wen, X., Zhang, C., Ji, Y., Zhao, Q., He, W., An, F., ... Guo, H. (2012, November). Activation of ethylene signaling is mediated by nuclear translocation of the cleaved EIN2 carboxyl terminus. *Cell Research*, Vol. 22, pp. 1613–1616. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.145>
- Wen, Y.-Z., Zheng, L.-L., Qu, L.-H., Ayala, F. J., & Lun, Z.-R. (2012). Pseudogenes are not pseudo any more. *RNA Biology*, *9*(1), 27–32. <https://doi.org/10.4161/rna.9.1.18277>
- Wilkinson, J. Q., Lanahan, M. B., Clark, D. G., Bleecker, A. B., Chang, C., Meyerowitz, E. M., & Klee, H. J. (1997). A Dominant Mutant Receptor From *Arabidopsis* Confers Ethylene Insensitivity In Heterologous Plants. *Nature Biotechnology*, *15*(5), 444–447. <https://doi.org/10.1038/nbt0597-444>
- Wilkinson, S., Kudoyarova, G. R., Veselov, D. S., Arkhipova, T. N., & Davies, W. J. (2012). Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management. *Journal of Experimental Botany*, *63*(9), 3499–3509. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers148>
- Win, N. M., Yoo, J., Kwon, S.-I., Watkins, C. B., & Kang, I.-K. (2019). Characterization of Fruit Quality Attributes and Cell Wall Metabolism in 1-Methylcyclopropene (1-MCP)-Treated ‘Summer King’ and ‘Green Ball’ Apples During Cold Storage. *Frontiers in Plant Science*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01513>
- Wolters, H., & Jürgens, G. (2009, May). Survival of the flexible: Hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 10, pp. 305–317. <https://doi.org/10.1038/nrg2558>
- Wu, Y.-S., & Yang, C.-Y. (2019). Ethylene-mediated signaling confers thermotolerance and regulates transcript levels of heat shock factors in rice seedlings under heat stress. *Botanical Studies*, *60*(1). <https://doi.org/10.1186/s40529-019-0272-z>
- Xie, J., Li, Y., Liu, X., Zhao, Y., Li, B., Ingvarsson, P. K., & Zhanga, D. (2019). Evolutionary origins of pseudogenes and their association with regulatory sequences in plants. *Plant Cell*, *31*(3), 563–578. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00601>

- Yamagami, T., Tsuchisaka, A., Yamada, K., Haddon, W. F., Harden, L. A., & Theologis, A. (2003). Biochemical diversity among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase isozymes encoded by the Arabidopsis gene family. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(49), 49102–49112. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308297200>
- YANG, J. C., ZHANG, J. H., YE, Y. X., WANG, Z. Q., ZHU, Q. S., & LIU, L. J. (2004). Involvement of abscisic acid and ethylene in the responses of rice grains to water stress during filling. *Plant, Cell and Environment*, 27(8), 1055–1064. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01210.x>
- Yang, L., Takuno, S., Waters, E. R., & Gaut, B. S. (2011). Lowly Expressed Genes in Arabidopsis thaliana Bear the Signature of Possible Pseudogenization by Promoter Degradation. *Molecular Biology and Evolution*, 28(3), 1193–1203. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq298>
- Yang, X., Song, J., Campbell-Palmer, L., Fillmore, S., & Zhang, Z. (2013). Effect of ethylene and 1-MCP on expression of genes involved in ethylene biosynthesis and perception during ripening of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 78, 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.11.012>
- Yokotani, N. (2003). Characterization of a novel tomato EIN3-like gene (LeEIL4). *Journal of Experimental Botany*, 54(393), 2775–2776. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg308>
- Yoo, A., Seo, Y. S., Jung, J. W., Sung, S. K., Kim, W. T., Lee, W., & Yang, D. R. (2006). Lys296 and Arg299 residues in the C-terminus of MD-ACO1 are essential for a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase enzyme activity. *Journal of Structural Biology*, 156(3), 407–420. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.08.012>
- Yoon, G. M. (2015). New insights into the protein turnover regulation in ethylene biosynthesis. *Molecules and Cells*, Vol. 38, pp. 597–603. <https://doi.org/10.14348/molcells.2015.0152>
- Yoshida, H., Nagata, M., Saito, K., Wang, K. L., & Ecker, J. R. (2005). *BMC Plant Biology Arabidopsis ETO1 specifically interacts with and negatively regulates type 2 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthases*. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-5-14>
- Young, T. E., Gallie, D. R., & DeMason, D. A. (1997). Ethylene-mediated programmed cell death during maize endosperm development of wild-type and shrunken2 genotypes. *Plant Physiology*, 115(2), 737–751. <https://doi.org/10.1104/pp.115.2.737>
- Yu, J., Ke, T., Tehrim, S., Sun, F., Liao, B., & Hua, W. (2015). PTGBase: an integrated database to study tandem duplicated genes in plants. *Database*, 2015. <https://doi.org/10.1093/database/bav017>
- Yu, W., Sheng, J., Zhao, R., Wang, Q., Ma, P., & Shen, L. (2019). Ethylene biosynthesis is involved in regulating chilling tolerance and SICBF1 gene expression in tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 149, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.11.012>
- Yu, Y. B., Adams, D. O., & Yang, S. F. (1979). 1-Aminocyclopropanecarboxylate synthase, a key enzyme in ethylene biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90420-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90420-X)
- Zarembinski, T. I., & Theologis, A. (1997). Expression characteristics of OS-ACS1 and OS-ACS2, two members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in rice

(*Oryza sativa* L. cv. Habiganj Aman II) during partial submergence. *Plant Molecular Biology*, 33(1), 71–77. <https://doi.org/10.1023/B:PLAN.0000009693.26740.c3>

Zhang, C., Zhang, L., Zhang, S., Zhu, S., Wu, P., Chen, Y., ... Wu, G. (2015). Global analysis of gene expression profiles in physic nut (*Jatropha curcas* L.) seedlings exposed to drought stress. *BMC Plant Biology*, 15(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0397-x>

Zhang, Z., Ren, J. S., Clifton, I. J., & Schofield, C. J. (2004). Crystal structure and mechanistic implications of 1-aminocyclopropane-1- carboxylic acid oxidase - The ethylene-forming enzyme. *Chemistry and Biology*, 11(10), 1383–1394. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.08.012>

Zhong, G., Huberman, M., Feng, X. Q., Sisler, E. C., Holland, D., & Goren, R. (2001). Effect of 1-methylcyclopropene on ethylene-induced abscission in citrus. *Physiologia Plantarum*, 113(1), 134–141. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1130118.x>

Zhou, Z. Y. (2009, March 1). An overview of fossil Ginkgoales. *Palaeoworld*, Vol. 18, pp. 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.palwor.2009.01.001>

CAPÍTULO 2

Identificação *in silico* e análise da expressão dos genes da biossíntese do etileno responsivos ao déficit hídrico em *Coffea arabica*

RESUMO

Tensões abióticas como a escassez no conteúdo de água do solo podem afetar negativamente o crescimento e interromper o desenvolvimento das plantas. Entretanto, no cafeeiro (*Coffea arabica*) a exposição ao déficit hídrico durante a fase reprodutiva, especificamente durante o florescimento, se mostrou um mecanismo efetivo para aumento na qualidade dos grãos. É extensivamente documentado que a interação entre fatores endógenos e ambientais seriam responsáveis por controlar a antese em *Coffea arabica*. Entretanto, o mecanismo regulador para promoção da abertura floral no cafeeiro ainda é desconhecido. Recentemente, a conexão entre o nível de expressão de genes que codificam as principais enzimas da via da biossíntese do etileno (ACS e ACO), em resposta às diferentes condições hídricas, e a promoção da antese no cafeeiro foi sugerida. Estudo prévio da caracterização de prováveis membros da via de biossíntese do etileno em café (*Coffea arabica*) resultou na identificação de 1 gene que codifica a enzima ACS e 3 genes homólogos para enzima a ACO, mas a análise da expressão foi realizada exclusivamente em frutos. Portanto, o perfil de expressão desses genes em outros tecidos permanece desconhecido e ampliar o entendimento sobre possíveis mecanismos regulatórios envolvidos no florescimento dessa espécie é essencial para o agronegócio do café. Considerando a possível influência do etileno sobre a antese do cafeeiro, o objetivo desse estudo foi identificar novos membros capazes de codificar isoformas das enzimas ACS e ACO, bem como determinar o perfil de expressão gênica em diferentes órgãos dos cafeeiros em condição de déficit hídrico. O experimento foi conduzido em casa de vegetação com plantas de *Coffea arabica* de 5 anos de idade cultivadas em vasos de 50L. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com duas condições hídricas (bem irrigado e déficit hídrico) e três repetições biológicas. Foram feitas análises de potencial hídrico foliar (ψ_{wf}) e caracterização da expressão quantitativa de seis genes alvos em folhas, gemas no estágio G5, flores e raízes. Plantas bem irrigadas apresentaram $\psi_{wf} = -0,3$ MPa enquanto plantas submetidas ao déficit hídrico apresentaram valores inferiores a $-3,0$ MPa. Foram identificados 4 prováveis genes ACS (*CarACS1*, *CarACS2*, *CarACS3*, *CarACS7*) e 3 prováveis genes ACO (*CarACO3*, *CarACO4*, *CarACO5*), mostrando que *Coffea arabica* possui pequenas famílias multigênicas para as enzimas ACS e ACO. A análise da expressão gênica mostrou que existem padrões de expressão únicos e sobrepostos dos genes ACS e ACO, e que essa expressão é dependente do órgão e da condição hídrica. Interessantemente, os genes ACO em cafeeiros sob déficit hídrico não apresentaram expressão diferencial em folhas, gemas e flores, mas foram reprimidos nas raízes. Em conjunto, esses resultados mostram que possivelmente o ACC produzido durante o déficit hídrico não é convertido em etileno, permanecendo acumulado nos órgãos, especialmente nas raízes durante o período seco.

Palavras-chave: Cafeeiro. Estresse hídrico. Hormônio.

ABSTRACT

Abiotic stresses as water deficit in the soil can affect negatively growth and development of plant. However, in coffee (*Coffea arabica*) exposure to water deficit during the reproductive phase, specifically during flowering, is an effective mechanism to increase the quality of grains. It is very studied that the interaction between endogenous and environmental factors would be responsible for controlling the anthesis time in *Coffea arabica*. However, the regulatory mechanism for promoting floral opening in coffee is still unknown. Recently, the connection between the level of expression of genes that encode the main enzymes in the ethylene biosynthesis pathway (ACS and ACO), in response to different water conditions, and the promotion of anthesis in coffee has been suggested. The isoforms of the ACS and ACO enzymes are encoded by multigenic families in plants used as model and plants of agronomic interest. Those genes may exhibit a divergent expression pattern, dependent on stress, cultivar, age and organ of the plant. Previous study of the characterization of probable members of the ethylene biosynthesis pathway in coffee (*Coffea arabica*) resulted in the identification of 1 gene encoding the ACS enzyme and 3 homologous genes for the ACO enzyme, but the expression analysis was performed exclusively on fruits. Therefore, the expression profile of these genes in other tissues remains unknown and expanding the understanding of possible regulatory mechanisms involved in the flowering of this species is essential for coffee agribusiness. Considering the possible influence of ethylene on coffee anthesis, the objective of this study was to identify new genes capable of encoding isoforms of the ACS and ACO enzymes, as well as to determine the profile of gene expression in different organs of coffee plants under water deficit condition. The experiment was conducted in a greenhouse with 5-year-old *Coffea arabica* plants, during the flowering period. A completely randomized design was used, with two water conditions (well irrigated and water deficit) and three biological replications. Analysis of leaf water potential and characterization of the quantitative expression of six target genes in leaves, buds in the G5 stage, flowers and roots were performed. Well water plants showed $\psi_{wf} = -0.3$ MPa while plants subjected to water deficit showed values below -3.0 MPa. 4 probable ACS genes (*CarACS1*, *CarACS2*, *CarACS3*, *CarACS7*) and 3 probable ACO genes (*CarACO3*, *CarACO4*, *CarACO5*) were identified, showing that *Coffea arabica* has small multigenic families for the ACS and ACO enzymes. The analysis of gene expression showed that there are unique and overlapping expression patterns of the ACS and ACO genes, and that this expression is dependent on the organ and water condition. Interestingly, the ACO genes in coffee plants under water deficit didn't show differential expression in leaves, buds and flowers, but were suppressed in the roots. Together, these results show that possibly the ACC produced during the water deficit is not converted into ethylene, remaining accumulated in the organs, especially in the roots during the drought period.

Keywords: Coffee tree. Water stress. Hormone.

1 INTRODUÇÃO

A sessilidade é um fator extremamente desafiador para a sobrevivência das plantas devido á exposição constante a múltiplos fatores ambientais adversos (DUBOIS et al., 2018), Dentre eles, tensões abióticas como a escassez no conteúdo de água do solo pode afetar negativamente o crescimento e interromper o desenvolvimento das plantas (JOSHI et al., 2016; KOCH et al., 2019; VISHWAKARMA et al., 2017). Analisando espécies cultivadas, perdas significativas no rendimento são comuns em muitas culturas importantes, já que a restrição hídrica limita o máximo potencial produtivo da planta (CONTI et al., 2019; FORNI et al., 2017). Entretanto, a ocorrência de prejuízos causados pelo déficit hídrico no metabolismo vegetal não dependem apenas da frequência e da severidade do estresse, mas também da espécie, do órgão e seu estágio de desenvolvimento (DEMIREVSKA et al., 2009; FORNI et al., 2017).

No cafeeiro (*Coffea arabica*) a exposição ao déficit hídrico durante a fase reprodutiva, especificamente durante o florescimento, se mostrou um mecanismo efetivo para aumento na qualidade dos grãos (GUERRA ET al., 2005). O florescimento sequencial é uma característica intrínseca da espécie (DE OLIVEIRA et al., 2014) e indesejável para o manejo da cultura, uma vez que, a abertura floral em tempos distintos promove o desenvolvimento assincrônico dos frutos. Em consequência, a maturação dos frutos é desuniforme, o que reduz a qualidade da xícara, a rentabilidade do produtor e impacta negativamente na comercialização dessa *commodity*. Estudos tem relatado, há algum tempo, que a antese no cafeeiro é obtida quando as plantas são submetidas a períodos de seca seguidos por reidratação (GUERRA et al., 2005; ROCHA et al., 2007; SOARES et al, 2005). Na literatura, é extensivamente documentado que a interação entre fatores endógenos e ambientais seriam responsáveis por controlar a antese em *Coffea arabica* (LEITE et al., 2004; CAMARGO & CAMARGO.; PICINI et al., 1999; SOARES et al., 2005). Entretanto, o mecanismo regulador para promoção da abertura floral no cafeeiro ainda é desconhecido.

A rápida percepção de tensões bióticas e abióticas, através da interação planta-ambiente, assegura o desenvolvimento de mecanismos para limitar os danos causados pelas perturbações do ambiente (DEPUYDT & HARDTKE, 2011). Durante o período seco ocorrem alterações em nível molecular, celular e de sistema que resultam de um ajuste fino na produção e sinalização de moléculas que atuam em conjunto para evitar efeitos deletérios á sobrevivência do vegetal (BASU ET AL. 2016; DEPAEPE & VAN DER STRAETEN, 2019; WILKINSON et al., 2012). Crisosto et al (1992) sugeriram que a antese no botão floral do cafeeiro é promovida por sinalização química, e as moléculas capazes de induzir esse processo seriam sintetizadas nas raízes durante o déficit hídrico. Nesse contexto, os fitohormônios poderiam

atuar como candidatos nessa função já que desempenham papel-chave na regulação de respostas das plantas durante o déficit hídrico (Albacete, Martínez-Andújar, & Pérez-Alfocea, 2014; Gray, 2004; Kohli, Sreenivasulu, Lakshmanan, & Kumar, 2013). O etileno, único hormônio gasoso dos vegetais, é um hidrocarboneto simples (C_2H_4) que está envolvido em muitos processos de crescimento e desenvolvimento em plantas superiores, (Abeles & Morgan, 1992; Chang, 2016; Graham et al., 2018; Liu et al., 2015). Além de desempenhar papel fundamental em diferentes fases do ciclo vegetal, o etileno atua na modulação de respostas a uma variedade de estresses, incluindo a deficiência hídrica (Arraes et al., 2015; Cao et al., 2008; Paudel & Bede, 2015; Sasidharan & Voesenek, 1991; Savada et al., 2017; Wu & Yang, 2019; Yu et al., 2019).

Recentemente, a conexão entre o nível de expressão de genes que codificam as principais enzimas da via da biossíntese do etileno, em resposta às diferentes condições hídricas, e a promoção da antese no cafeeiro foi sugerida (LIMA, 2015). As isoformas da 1-Aminociclopropano-1-Carboxilato sintase (ACS) e 1-Aminociclopropano-1-Carboxilato oxidase (ACO) são codificadas por famílias multigênicas na espécie modelo *Arabidopsis thaliana* (GÓMEZ-LIM et al., 1993; YAMAGAMI et al., 2003) e podem ser diferencialmente expressas em resposta a tensões ambientais (Tsuchisaka & Theologis, 2004b). Adicionalmente, estudos realizados em importantes espécies agronômicas como soja (Arraes et al., 2015), milho (Gallie & Young, 2004), arroz (Iwai et al., 2006) e tomate (Seymour et al., 2013) demonstraram que a biossíntese do etileno também é regulada por uma família multigênica e seus membros podem exibir um padrão de expressão divergente, dependente do estresse, cultivar, idade e órgão da planta. Estudo prévio da caracterização de prováveis membros da via de biossíntese do etileno em café (*Coffea arabica*) resultou na identificação de 1 gene que codifica a enzima ACS e 3 genes homólogos para enzima ACO, mas a análise da expressão foi realizada exclusivamente em frutos (Ságio et al., 2014). Portanto, o perfil de expressão desses genes em outros tecidos permanece desconhecido e ampliar o entendimento sobre possíveis mecanismos regulatórios envolvidos no florescimento dessa espécie é essencial para o agronegócio do café. Considerando a possível influência do etileno sobre a antese do cafeeiro, objetivou-se com esse estudo identificar novos membros capazes de codificar isoformas das enzimas ACS e ACO, bem como determinar o perfil de expressão gênica em diferentes órgãos dos cafeeiros em condição de déficit hídrico. e seus membros podem exibir um padrão de expressão divergente, dependente do estresse, cultivar, idade e órgão da planta. Estudo prévio da caracterização de prováveis membros da via de biossíntese do etileno em café (*Coffea arabica*) resultou na identificação de 1 gene que codifica a enzima ACS e 3 genes homólogos para enzima a ACO,

mas a análise da expressão foi realizada exclusivamente em frutos (Ságio et al., 2014). Portanto, o perfil de expressão desses genes em outros tecidos permanece desconhecido e ampliar o entendimento sobre possíveis mecanismos regulatórios envolvidos no florescimento dessa espécie é essencial para o agronegócio do café. Considerando a possível influência do etileno sobre a antese do cafeeiro, objetivou-se com esse estudo identificar novos membros capazes de codificar isoformas das enzimas ACS e ACO, bem como determinar o perfil de expressão gênica em diferentes órgãos dos cafeeiros em condição de déficit hídrico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Identificação *in silico* das seqüências homólogas e análises filogenéticas de *Coffea arabica*

Os genes que codificam enzimas na biossíntese de etileno e nas vias de resposta em *Arabidopsis thaliana* foram recuperados do banco de dados KEGG (AOKI & KANEHISA, 2005). Cada uma dessas seqüências de proteínas desses genes foi usada como entrada para realizar pesquisas de similaridade com os genomas de espécies vegetais de diferentes ordens, como *Solanales*, *Gentianales*, *Brassicales*, *Cucurbitales*, *Rosales*, *Fabales*, *Malpighiales*, *Vitales*, *Poales*, *Amborellales*, *Ginkgoales* e a samambaia *Selaginella moellendorffii*. Essas pesquisas foram feitas com BLAT (versão 36x2) (KENT, 2002) com os parâmetros "-minIdentity" definido como 50 e "-maxIntron" definido como 10500. O parâmetro "-minIdentity" controla a identidade mínima entre a proteína inserida e a genômica. A seqüência de DNA traduzida em seis quadros de leitura e o "-maxIntron" define o tamanho máximo de íntron no genoma referenciado.

Todas as seqüências de proteínas previstas para uma enzima específica foram submetidas a um filtro de comprimento, apenas proteínas com comprimento superior a 70% da seqüência de entrada de *Arabidopsis thaliana* foram consideradas para etapas posteriores. Além disso, removemos da análise as proteínas previstas cuja seqüência inserida estava abaixo de 70% de seu comprimento. Estas etapas foram realizadas para relatar apenas enzimas com um comprimento semelhante. As seqüências previstas restantes e a seqüência inserida para cada enzima foram então alinhadas com o MAFFT (versão 7.427) (KATO & TOH, 2008) através da orientação do script perl (versão 2.02) (SELA ET AL., 2015). O parâmetro de orientação "-colCutoff" foi definido em 0,93 para remover seqüências previstas não confiáveis.

Apenas uma enzima por espécie foi relatada com base em múltiplas interações da análise filogenética com o pacote de orientação Phylip (versão 3.698) (FELSENSTEIN, 1993). Primeiramente, o resultado do alinhamento da orientação foi inicializado para 1000

reamostragens aleatórias com o SEQBOOT. Depois disso, as medidas de distância foram calculadas usando o PROTDIST usando estimativas de máxima verossimilhança com base no modelo de matriz JTT. Árvores não enraizadas foram produzidas com NEIGHBOR, embora o método de associação de vizinhos e a árvore de consenso final tenham sido produzidos com CONSENSE, que calcula árvores pelo método de consenso da regra da maioria. Se uma proteína específica na árvore de consenso não refletiu sua distribuição filogenética da espécie, ela foi removida da análise.

Finalmente, as seqüências de proteínas *Coffea arabica* e *Coffea canephora* foram alinhadas com as seqüências de plantas no banco de dados do NCBI por meio da ferramenta BLAST online (ALTSCHUL et al., 1990) disponível em (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Esta etapa foi realizada para verificar se a proteína prevista é homóloga de qualquer proteína depositada no banco de dados NCBI.

2.2 Desenho de primers para RT- qPCR

Com base nas seqüências obtidas na análise *in silico*, os iniciadores *forward* e *reverse* para a amplificação de fragmentos via PCR quantitativa (RT-qPCR) para os genes *CarACS3-like* e *CarACS7-like* foram projetados utilizando a ferramenta OligoAnalyzer da IDT (*Integrated DNA Technologies*; <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Os pares de primers para os genes *CaACS1-like*, *CaACO1-like*, *CaACO4-like* e *CaACO5-like* foram selecionados do estudo anterior (Ságio et al., 2014) (Tabela 1).

Tabela 1 – Sequência dos primers para amplificação de transcritos na PCR quantitativa (RT-qPCR), em que: TM – a temperatura de *melting* e E – eficiência de anelamento do primer.

Gene	Sequência do primer (5' – 3')	Concentração (μ M)	Volume (μ L)	Tm ($^{\circ}$ C)	E (%)	Autor
ACS1	F: TTGTTTGTCACAGCTCCAATG R: TCCCAATGGATTTGATGGAT	1	1,5	53,8 51,6	90	Ságio et al (2014)
ACS3	F: GCTGCTTCTTCTCTTTTTGCCT R: CTGCCATCCCAGGAAGTACG	2	3,0	59,0 60,0	93	Esse estudo
ACS7	F: TTCGCAGACACAGCAGCT R: ATGCCCTATTTCTCAAGCC	2	3,0	57,3 55,0	100	Esse estudo

<i>ACO1</i>	F: ACGTGGAAGCCAATGTTACC R:GAGGGAGAAGAAAACATCC TAGC	1	1,5	55,5 55,0	96	Ságio et al (2014)
<i>ACO4</i>	F: CGCAACTGTTTGAGATCACG R: CCAATCCAAGCATTAACAAG G	1	1,5	54,4 54,1	95	Ságio et al (2014)
<i>ACO5</i>	F: GCTCTTGTATCCCGGAGGTT R: GAGTTTGGGAGCCTTGTCAG	1	1,5	56,6 55,8	93	Ságio et al (2014)
<i>RPL3</i> 9	F:GCGAAGAAGCAGAGGCAGA A R: TTGGCATTGTAGCGGATGGT	2	3,0	59,0 60,0	87	(Fernandes- Brum et al., 2017)
<i>AP47</i>	F:GGTGTACGCTCACCATTTTC ATC R:AGCCAACAGCACCAGTAAC TTG	1,5	2,25	59,0 58,0	97	Fernandes- Brum et al (2017)

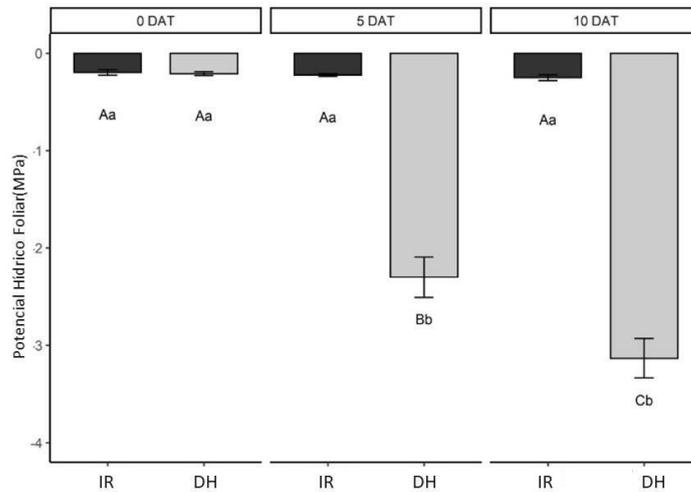
Fonte: Do autor (2020).

2.3 Condição de crescimento das plantas, tratamentos e amostragem das plantas para RT-qPCR

O experimento foi conduzido em casa de vegetação com plantas de *Coffea arabica* de 5 anos de idade cultivadas em vasos de 50L. As plantas foram mantidas bem irrigadas (100% da capacidade de campo) durante sete dias. Após esse período, o tratamento de restrição hídrica foi iniciado com a suspensão da irrigação para um grupo de plantas enquanto outro grupo continuo recebendo irrigação diariamente. A reposição da água perdida por transpiração e evapotranspiração no grupo de plantas bem irrigadas era realizada ao final de cada dia, observando-se o encharcamento do solo até o escoamento da água pela extremidade inferior dos vasos. Cada tratamento era composto por três repetições biológicas em delineamento inteiramente casualizado.

O status hídrico das plantas foi monitorado com câmara de pressão (PMS *Instruments-Plantmoisture-* Modelo 1000) tipo Scholander (SCHOLANDER et al., 1965) em folhas completamente expandidas localizadas entre o 3° e 5° nó. A análise foi realizada a cada três dias, entre 3h e 5h da manhã. O período experimental foi determinado pelos valores de potencial hídrico foliar (ψ_{wf}) obtidos nas plantas submetidas ao déficit hídrico (Figura 6). Quando as plantas desse tratamento apresentaram ψ_{wf} antemanhã de, no mínimo, -3,0 MPa (LIMA, 2015), o experimento foi finalizado e folhas, flores, gemas no estágio G5 e raízes foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80.

Figura 6 – Potencial hídrico foliar de *Coffea arabica* nos tratamentos irrigado (IR) e déficit hídrico (DH).



Legenda: As barras representam média de três repetições e erro padrão. Letra maiúsculas comparam as condições (IR - Irrigado e DH - Déficit Hídrico) entre cada período experimental (0, 5 e 10 DAT), Letras minúsculas comparam cada condição (IR ou DH) dentro dos períodos experimentais (0, 5 e 10 DAT). Letras diferentes indicam diferenças significativas com $P < 0.05$ (Scott Knott teste).

Fonte: Do autor (2020).

2.4 Isolamento de RNA e síntese de cDNA

Inicialmente, os tecidos foram macerados utilizando nitrogênio líquido e acrescidos de Polivinilpolipirrolidona (PVPP). 200mg do material macerado foi adicionado em tubos de 2mL para extração do RNA total pelo método CTAB. O tampão de extração foi preparado de acordo com Chang et al., 1993 e o protocolo original adaptado para tecidos de *Coffea arabica*.

O tampão de extração foi pré-aquecido em banho-maria á 65°C durante 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 700µL do tampão e 100µL de β-mercaptoetanol, homogeneizou em agitador de tubos por 2 minutos e incubou-se a 65°C por 20 minutos. Acrescentou-se 800µL clorofórmio, agitador de tubos por 2 minutos e centrifugou-se a 4°C por 10 minutos a 15000rpm. Coletou-se 550µL do sobrenadante e transferiu-se para tubos de 1,5mL. Adicionou-se o mesmo volume de clorofórmio, agitador de tubos e centrifugação por 10 minutos a 4°C. Coletou-se 500µL do sobrenadante e transferiu-se para novos tubos de 1,5mL. Adicionou-se o mesmo volume de clorofórmio, agitador de tubos e centrifugação por 10 minutos a 4°C. Coletou-se 450µL do sobrenadante e transferiu-se para novos tubos de 1,5mL. Adicionou-se o mesmo volume de clorofórmio, agitador de tubos e centrifugação por 10 minutos a 4°C. Adicionou-se 104 µL do LiCl₂ 12 M (esse volume terá a concentração final de 2,5M). Deixou-se os tubos precipitando *overnight* a -20°C. Posteriormente, centrifugou-se por 30 minutos á 17000 g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 1mL de LiCl₂ 12M. Centrifugou-se durante

15 minutos a 17000 g á 4°C e o sobrenadante foi descartado adicionando-se 1mL de etanol 70%. Centrifugar novamente a 17000 g por 10 minutos a 4 °C. Essa etapa foi realizada duas vezes. Finalmente, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 20 µL de água MiliQ.

As amostras de RNA (5,0 µg) foram tratadas com Turbo-free DNA Kit (Life Technologies) para remoção de DNA genômico residual. A concentração do RNA foi determinada via quantificação por espectroscopia utilizando NanoVue™ (GE Healthcare Life Sciences, São Paulo, SP, Brasil). Para a avaliação da integridade do RNA, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% e visualizado no fotodocumentador UV-transilluminator (UVITEC FireReader XS D-77Ls-20.M). A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de 1,0 µg de RNA utilizando o Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Applied Biosystems™ (Life Technologies), seguindo as recomendações do fabricante.

2.5 Análise da expressão gênica via RT- qPCR

A análise da especificidade e eficiência da amplificação de cada primer desenhado nesse estudo foi realizada segundo Fernandes-Brum et al (2017). A análise da expressão dos genes foi realizada em termociclador Rotor-Gene Q Real-Time PCR (Venlo, Holanda), utilizando sistema de detecção SYBR® Green (QuantiFast SYBR Green PCR Kit – Qiagen). O volume final da reação foi de 15µL: 7,5µL de SYBR Green, 1,5µL de cDNA e concentrações específicas de primer e água para cada gene (Tabela 1). As condições para RT-qPCR foram: 5 min a 95 °C para ativação da enzima, seguidos de 40 ciclos de 5 s a 95 °C e 10 s a 60 °C, finalizando com uma curva de *melting* para análise da especificidade da reação, aumentando-se a temperatura 1 °C a cada 5 s, numa rampa de 60 °C a 95 °C. Para o gene *ACSI*, excepcionalmente, os 40 ciclos ocorreram com a temperaturas 58°C no anelamento do primer. Foram utilizadas três repetições biológicas de cada tratamento e tipo de tecido analisado, sendo utilizadas triplicatas técnicas para cada uma das amostras.

A expressão relativa foi calculada pelo método $\Delta\Delta CT$ (PFAFFL, 2001) usando os genes de referência *AP47* e *RPL39* (**Tabela 1**). Os cálculos da razão de expressão e os intervalos de confiança foram submetidos a análise estatística com modelo linear misto Steibel et al (2009). O modelo é dado pela equação:

$$y_{iklm} = \mu + TG_{ik} + \Pi + e_{iklm}$$

em que y_{iklm} é o Cq (ciclo de quantificação) obtido do software do termociclador para o k-ésimo gene (referência ou alvo) do m-ésimo poço, correspondente à l-ésima planta sujeita ao i-ésimo tratamento (IR, DH) ; TG_{ik} é o efeito da combinação do i-ésimo tratamento (IR, DH)

na expressão do gene k (referência ou alvo); em que a combinação do i -ésimo (folha, gema, flor ou raiz) e o j -ésimo (IR ou DH); $II \sim N(0, \sigma^2_{lk})$ é um efeito aleatório específico da planta; e $e_{ijklm} \sim N(0, \sigma^2)$ é um termo residual.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise filogenética

Proteínas associadas aos membros de todas as etapas da via de biossíntese em *Coffea arabica* foram classificadas a partir do alinhamento múltiplo das sequências de resíduos de aminoácidos com base na presença de um domínio para definir uma família, porque é provável que sequências com o mesmo domínio proteico sejam homólogas (WANG et al., 2018). Portanto, baseados nos critérios de homologia e filogenia caracterizamos as sequências identificadas em nossas buscas. O estudo *in silico* do genoma de *Coffea arabica* permitiu a identificação de sequências gênicas relacionadas com as duas principais enzimas da rota de biossíntese do etileno (ACS e ACO) a partir da comparação com sequências proteicas órtologas de 21 espécies, utilizando o parâmetro de identidade igual ou superior a 70% e cobertura mínima de 50%. Todas as sequências de *Coffea arabica* foram preditas e curadas manualmente. Os padrões de similaridade foram verificados por árvores filogenéticas e a análise cladística forneceu evidências sobre o agrupamento dos genes. Análises filogenéticas para o estudo de identificação e caracterização de genes em *Coffea arabica*, frequentemente, incluem sequências de *Coffea canephora*, porque além de pertencer ao mesmo gênero, *Coffea canephora* é um dos progenitores de *Coffea arabica* (LASHERMES et al., 1999). Portanto, a clusterização entre ortólogos dessas espécies já era esperado em todas as enzimas avaliadas.

3.1.1 Família dos genes ACS

A comparação por homologia de sequências identificou, inicialmente, 9 possíveis genes ACS em *Coffea arabica* (*CarACS 1-4*, *CarACS 6-8*, *CarACS10*, *CarACS12*). A clusterização com *Coffea canephora* (CcACS) foi verificado para ACS7, ACS10 e ACS12, enquanto as demais permaneceram no mesmo clado (Figura suplementar 1). No entanto, ACS3 clusterizou diretamente com as ACS4 e ACS8, assim como ACS1 e ACS2 clusterizaram entre si. No filtro de similaridade, ACS2, ACS4 e ACS8 foram removidas por conter homologia superior a 98%. Possivelmente, a elevada semelhança entre essas sequências pode ter sido causada por duplicação genética. A ausência de refinamento em pesquisas de similaridade de sequência, comumente, pode gerar anotação incorreta em repositórios de dados moleculares (HOUBEN & VAN DE POEL, 2019) e o pipeline apurado das nossas observações confirma que houve erro

de anotação no genoma de *Coffea arabica* ao nomear as ACS2, 4 e 8 genes distintos. O mecanismo de duplicação de genes é uma das causas da complexidade nos genomas mas também da promoção da diversidade genética entre os organismos (BALAKIREV & AYALA, 2003; WANG et al., 2018). Esse evento produz cópias de genes que podem adquirir funções distintas do gene parental, mas é muito comum ocorrer redundância entre genes que por apresentar alta homologia de nucleotídeos, desenvolverem funções semelhantes ao seu parental (TUTAR, 2012). Os genes *SEPALLATA*, da família MADS box, são exemplos da duplicações que preservaram a redundância de função entre cópias de genes (DITTA et al., 2004; PELAZ et al., 2000). Nossa análise revelou que as ACS removidas eram provenientes de regiões genômicas muito próximas e é provável que tenham sido originadas de duplicações em tandem. A proporção de duplicação local é variável entre as espécies (VUKAŠINOVIĆ et al., 2014; YU et al., 2015) e, muitas vezes, sequências repetitivas são excluídas ou incapacitadas de codificar RNA ou proteínas funcionais, originando os pseudogenes (VANIN, 1985), a exemplo da ACS3 em *Arabidopsis thaliana* (YAMAGAMI et al., 2003). A manutenção de sequências sem promotor ou com acúmulo de mutações nos genomas foi incompreensível durante muitos anos (ANDERSSON & ANDERSSON, 2001; FORCE et al., 1999; JACQ et al., 1977), mas na última década os pseudogenes demonstraram ser funcionais e colaborar com mecanismos de regulação nas plantas (WEN et al., 2012; XIE et al., 2019; YANG et al., 2011).

A análise comparativa mostra que ACS2 apresenta 98,5% de identidade com ACS1. A diferença de 1,5% entre essas sequências resulta dos 21 resíduos de aminoácidos específicos da ACS1. Em virtude disto, consideramos que a sequência nomeada como ACS2 em *Coffea arabica* pode ser resultado da duplicação do gene *CaACSI-like*, que foi identificado, sequenciado e depositado no National Center for Biotechnology Information (NCBI - KF975694) e demonstrou ser um gene funcional (SÁGIO et al 2014). No entanto, para ACS6, 29% da diferença foi verificada em relação à sequência do gene *ACSI* (Figura 7A), além de agrupar em um ramo mais distante na árvore filogenética. Em conjunto, esses seriam indícios de que o ACS6 poderia ser um novo gene em *Coffea arabica*. Contudo, CarACS6 clusterizou com ACS2 de *Coffea canephora* (CcACS2) e as sequências de aminoácidos são 100% idênticas (Figura 7B).

Figura 7 – Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas CarACS6, CcACS2 e CarACS2 geradas pelo programa ClustalX.

(A)

```

CarACS1/1-469 1 LLSKMATNDGHEGNSPYFDGWAYSDPYHPTRNPNV IQMGLAENLQFDL IEEWLNPEASICTAEGANKFMEVAIYQDYHGLPEFRNAVAGMEKVRGE RVKFDPNRI VMSGGATGAREHLAFCLADP 133
CarACS2/1-455 1 --LSKMATNDGHEGNSPYFDGWAYSDPYHPTRNPNV IQMGLAENLQFDL IEEWLNPEASICTAEGANKFMEVAIYQDYHGLPEFRNAVAFMEKVRGE RVKFDPNRI VMSGGATGAREHLAFCLADP 131

CarACS1/1-469 134 DAFLVPTPYYPGDRDLWRRTG IQLLP IYVHSNDFAVTKESMEAAAYQAEANI RVKGFLLNPNPLQTLVLDRETL D I VTF I NDKN IHLI CDEIYSATVFSQPEF I S I S E I I E H D V Q N R D L I H L V Y S L 200
CarACS2/1-455 132 DAFLVPTPYYPGDRDLWRRTG IQLLP IYVHSNDFAVTKESMEAAAYQAEANI RVKGFLLNPNPLQTLVLDRETL D I VTF I NDKN IHLI CDEIYSATVFSQPEF I S I S E I I E H D V Q N R D L I H L V Y S L 204

CarACS1/1-469 207 KDLGFPGRFVGLVSYNDAVVSDGRMSSFGVLSQTQHL IASMLSDDEI I D H F L T S S M R L A R H O L F T R G L A Q V G I G T L K S S A G L Y F M D L R R L L R E S T F E A E M L W R I I H E V K L N V S P G S F H C S E P G 300
CarACS2/1-455 205 KDLGFPGRFVGLVSYNDAVVSDGRMSSFGVLSQTQHL IASMLSDDEI I D H F L T S S E R L A A R H O L F T R G L A Q V G I G T L K S S A G L Y F M D L R R L L R E S T F E A E M L W R I I H E V K L N V S P G S F H C S E P G 307

CarACS1/1-469 400 R V C F A N M D D E S V R V A L R R I H K F V L V Q K A T E P T T P K S R C G S K L Q L S L S F R R L D E R V M G S H M M S P H S P 400
CarACS2/1-455 398 R V C F A N M D D E S V R V A L R R I H K F V L V Q K A T E P T T P K S R C G S K L Q L S L S F R R L D E R ..... 405

```

(B)

```

CarACS1/1-430 1 LLSK IATNEQHGNSPYFDGWAYSDPYHPTONPNV IQMGLAENLQFDL IEEWLNPEASICTSEGVQVFRD I A I F D D Y H G L T E F R N A V A R F M K V R G R V I T F D P A R I V M S G G A T G A C E L I T C L A D P 133
CarACS2/1-455 1 --LSK IATNEQHGNSPYFDGWAYSDPYHPTONPNV IQMGLAENLQFDL IEEWLNPEASICTSEGVQVFRD I A I F D D Y H G L T E F R N A V A R F M K V R G R V I T F D P A R I V M S G G A T G A C E L I T C L A D P 132

CarACS1/1-430 134 DAFLVPTPYYPGDRDLWRRTG IQLP IYVHSNDFAVTKESMEAAAYQAEANI RVKGFLLNPNPLQTLVLDRETL D I VTF I NDKN IHLI CDEIYSATVFSQPEF I S I S E I I E H D V Q N R D L I H L V Y S L 205
CarACS2/1-429 133 DAFLVPTPYYPGDRDLWRRTG IQLP IYVHSNDFAVTKESMEAAAYQAEANI RVKGFLLNPNPLQTLVLDRETL D I VTF I NDKN IHLI CDEIYSATVFSQPEF I S I S E I I E H D V Q N R D L I H L V Y S L 204
CarACS2/1-455 133 DAFLVPTPYYPGDRDLWRRTG IQLP IYVHSNDFAVTKESMEAAAYQAEANI RVKGFLLNPNPLQTLVLDRETL D I VTF I NDKN IHLI CDEIYSATVFSQPEF I S I S E I I E H D V Q N R D L I H L V Y S L 205

CarACS1/1-430 206 KDLGFPGRFVGLVSYNDAVVSDGRMSSFGVLSQTQHL IASMLSDDEI I D H F L T S S M R L A R H O T T S G L E E V G I K C L N S A G L F C M D L R P L L K E P T F E A M L W R L I V H K V K L N V S P G S F H C V E P G 308
CarACS2/1-429 205 KDLGFPGRFVGLVSYNDAVVSDGRMSSFGVLSQTQHL IASMLSDDEI I D H F L T S S M R L A R H O T T S G L E E V G I K C L N S A G L F C M D L R P L L K E P T F E A M L W R L I V H K V K L N V S P G S F H C V E P G 307
CarACS2/1-455 206 KDLGFPGRFVGLVSYNDAVVSDGRMSSFGVLSQTQHL IASMLSDDEI I D H F L T S S E R L A A R H O L F T R G L A Q V G I G T L K S S A G L Y F M D L R R L L R E S T F E A E M L W R I I H E V K L N V S P G S F H C S E P G 308

CarACS1/1-430 399 R V C F A N M D D E T L E I A L K R I T I F I Q A T E R N D M ..... 430
CarACS2/1-429 398 R V C F A N M D D E T L E I A L K R I T I F I Q A T E R N D M ..... 429
CarACS2/1-455 399 R V C F A N M D D E S V R V A L R R I H K F V L V Q K A T E P T T P K S R C G S K L Q L S L S F R R L D E R ..... 455

```

Legenda: Resíduos idênticos entre as três sequências estão em azul escuro e resíduos idênticos apenas entre duas sequências estão em azul claro. Linha tracejada indica perda de resíduos.

Fonte: Do autor (2020).

Isso fornece evidências de que, possivelmente, ocorreu erro na anotação e a sequência nomeada como ACS6 em *Coffea arabica* é, provavelmente, o homólogo ACS2. Um ponto importante é observar que as ACS6 de outras espécies na árvore agruparam no mesmo clado que as ACS1 e ACS2 (Figura suplementar 1), sinalizando elevada semelhança nas sequências desses homólogos, o que pode ter causado o equívoco na nomeação dos genes em *Coffea arabica*. Portanto, nesse trabalho, renomeamos a sequência de CarACS6 para CarACS2.

A ACS3 também foi identificada anteriormente a partir de *contigs* no repositório do CafEST (LIMA et al. 2011). A identificação da ACS3 com predição no genoma, em nosso trabalho, reforça a possibilidade de existência desse homólogo no cafeeiro Arábica. Da mesma forma que os homólogos ACS1 e ACS2 eram muito semelhantes, há evidências de que ACS3, ACS4 e ACS8 tenham resultado da duplicação genética. Esses homólogos compartilham mais de 98% de identidade e a diferença entre eles reside nos 7 resíduos de aminoácidos presentes apenas na sequência da ACS3 e nos *gaps* existentes nas sequências as ACS3 e ACS4 (Figura 8).

Figura 8 – Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas CarACS4, CarACS8 e CarACS3 geradas pelo programa ClustalX.

```

CarACS4/1-461 1 ... LSRKATQNSHGQSSYFLGWDEYEKNPYDEVNRPTG I IOMGLAESOLSFOLLESWLAENPDASGFTRNGESIFRELALFDQYHGLPAFKKALAEFMEE I RGNKVTFDPRNLVLTAGATSANETLAFGLAE 130
CarACS8/1-464 1 MKLLSRKATQNSHGQSSYFLGWDEYEKNPYDEVNRPTG I IOMGLAESOLSFOLLESWLAENPDASGFTRNGESIFRELALFDQYHGLPAFKKALAEFMEE I RGNKVTFDPRNLVLTAGATSANETLAFGLAE 133
CarACS3/1-463 1 MKLLSRKATQNSHGQSSYFLGWDEYEKNPYDEVNRPTG I IOMGLAESOLSFOLLESWLAENPDASGFTRNGESIFRELALFDQYHGLPAFKKALAEFMEE I RGNKVTFDPRNLVLTAGATSANETLAFGLAE 133

CarACS4/1-461 131 PGEAFLLPTPYPGFDRDLKWRTOVE I VPI OCTSSNOFR I TESALEDAYDLARKQHLRVKQVLTNPSNPLQTA VSRPELNLLSF I SAKN I HL I SDE I YSOTVFSSPSFVSVMVELLERNLANTQVWNRVHL 203
CarACS8/1-464 134 PGEAFLLPTPYPGFDRDLKWRTOVE I VPI OCTSSNOFR I TESALEDAYDLARKQHLRVKQVLTNPSNPLQTA VSRPELNLLSF I SAKN I HL I SDE I YSOTVFSSPSFVSVMVELLERNLANTQVWNRVHL 206
CarACS3/1-463 134 PGEAFLLPTPYPGFDRDLKWRTOVE I VPI OCTSSNOFR I TESALEDAYDLARKQHLRVKQVLTNPSNPLQTA VSRPELNLLSF I SAKN I HL I SDE I YSOTVFSSPSFVSVMVELLERNLANTQVWNRVHL 206

CarACS4/1-461 204 VYSLSKDLGLPGFRVGA I YSNNTVVAAATKMSFGLVSSQTOYLLSAMLADKFKTKHY I FENVRLOKRHMLVRGLKNAQ I SGLDSNAGLFCOWDMRHLLTSKSFDAEMELWKK I VYOVGLN I SPGSSCHQ 300
CarACS8/1-464 207 VYSLSKDLGLPGFRVGA I YSNNTVVAAATKMSFGLVSSQTOYLLSAMLADKFKTKHY I FENVRLOKRHMLVRGLKNAQ I SGLDSNAGLFCOWDMRHLLTSKSFDAEMELWKK I VYOVGLN I SPGSSCHQ 300
CarACS3/1-463 207 VYSLSKDLGLPGFRVGA I YSNNTVVAAATKMSFGLVSSQTOYLLSAMLADKFKTKHY I FENVRLOKRHMLVRGLKNAQ I SGLDSNAGLFCOWDMRHLLTSKSFDAEMELWKK I VYOVGLN I SPGSSCHQ 300

CarACS4/1-461 307 REPWF RVCFANMSEETLDLAMGR I KDFVVSTATKSSNTGRSHLSSKYSARKLSKWWFRLSFH 401
CarACS8/1-464 400 REPWF RVCFANMSEETLDLAMGR I KDFVVSTATKSSNTGRSHLSSKYSARKLSKWWFRLSFH 404
CarACS3/1-463 400 REPWF RVCFANMSEETLDLAMGR I KDFVVSTATKSSNTGRSHLSSKYSARKLSKWWFRLSFH 403

```

Legenda: Resíduos idênticos entre as três sequências estão em azul escuro e resíduos idênticos apenas entre duas sequências estão em azul claro. Linha tracejada indica perda de resíduos (*gaps*).

Fonte: Do autor (2020).

Apesar da clusterização entre *CarACS3* e *CcACS4*, optamos por não renomear este homólogo, mas considerar a diferença na sequência da *CarACS3*. Além disso, é interessante notar que *Amborella trichopoda* também possui ACS3 e que ela clusteriza com ACS11 em *Ginkgo biloba*, sugerindo que a ACS3 pode ser a proteína mais primitiva em relação as ACS4 e ACS8. Essas espécies, atualmente, compartilham uma característica interessante: são as únicas representantes de suas famílias. *Amborella trichopoda* é a única espécie da família Amborelaceae e *Ginkgo biloba* é a única espécie extante da família Ginkgoaceae. Ambas são consideradas as espécies mais basais dentro de seus grupos e *Amborella trichopoda* é considerada a espécie com flor mais basal na linhagem das angiospermas (GUAN et al., 2016; PARKINSON et al., 1999; VILLEGENTE et al., 2017; ZHOU, 2009). O agrupamento entre elas indica semelhança entre suas sequências, possivelmente, pela característica ancestral em relação as demais espécies. Aqui, definimos que a família ACS em *Coffea arabica* é composta por 6 possíveis genes ACS: *ACS1*, *ACS2*, *ACS3*, *ACS7*, *ACS10* e *ACS12*.

Em paralelo, identificamos para *Coffea canephora* 7 possíveis genes homólogos da ACS (*ACS1-4*, *ACS7*, *ACS10*, *ACS12*). Filogeneticamente, apenas as *ACS1* e *ACS2* clusterizaram entre si e apesar de conter 95% de identidade, nossa análise identificou que essas sequências estão localizadas em cromossomos diferentes. Existe pouca discrepância entre o número de ACS em *Coffea canephora* e *Coffea arabica*. É possível que ao longo da evolução *Coffea arabica* tenha perdido algumas regiões cromossômicas ou que o sequenciamento do genoma não esteja completo e, dessa forma, a função da ACS4 perdida pode ter sido assumida por outra ACS. Essa seria outra explicação para semelhança entre as sequências de ACS3 e ACS4 encontradas nesse trabalho, e reforça a hipótese de erro de anotação como discutido anteriormente. Vale salientar que *Coffea arabica* resulta do cruzamento entre *Coffea*

canephora e *Coffea eugenioides*, mas pela ausência do sequenciamento completo do genoma deste último, focamos nossa comparação apenas entre *Coffea canephora* e *Coffea arabica*. De acordo com nossa análise, as ACS de *Coffea canephora* estão distribuídas em 6 cromossomos, mas ainda não é possível obter essa informação para *Coffea arabica* porque, embora sequenciado e parcialmente anotado, o genoma utilizado nesse estudo ainda não está montado ao nível cromossômico.

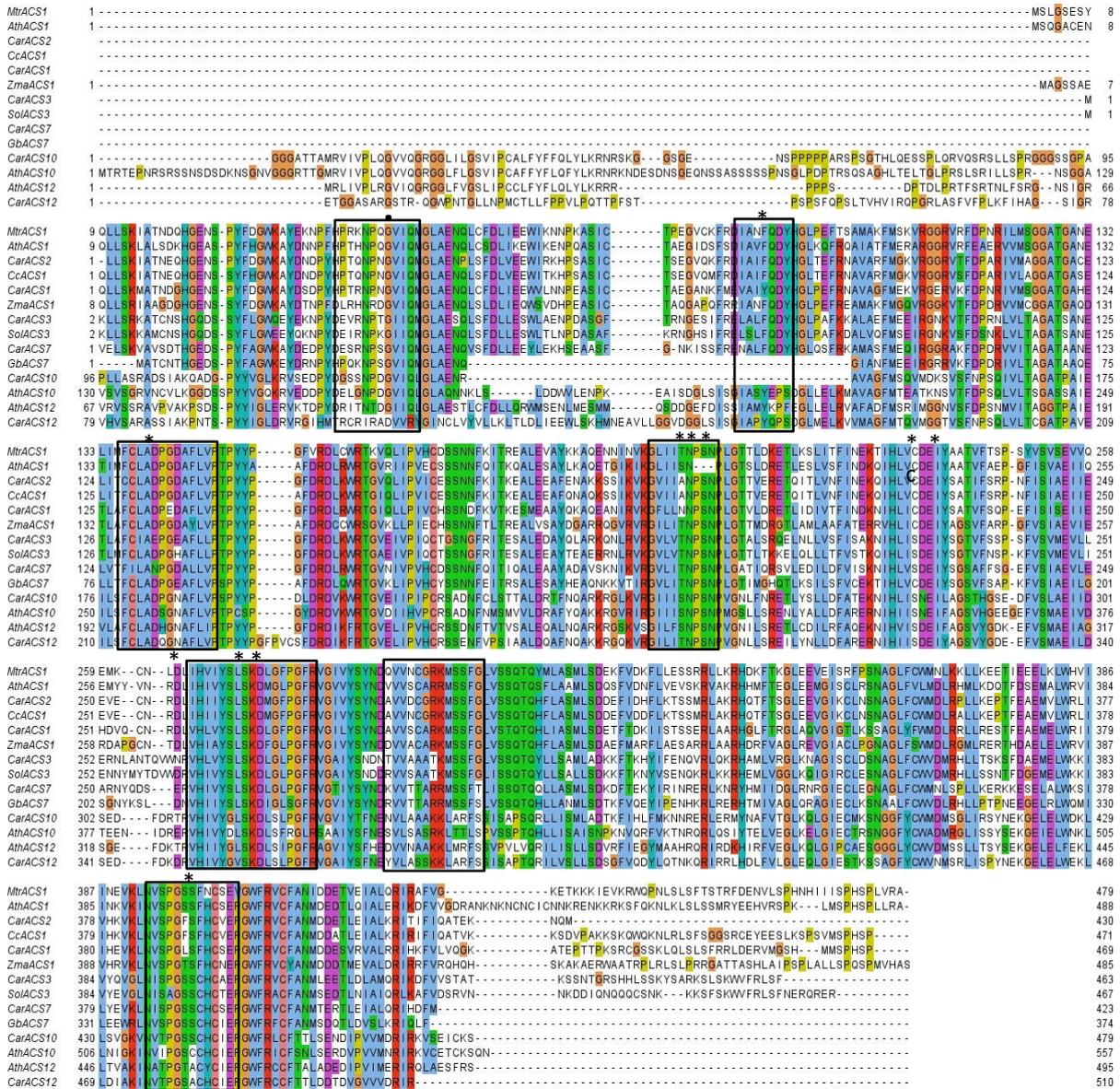
A família do gene ACS em *Arabidopsis thaliana* é composta por 12 genes ACS distribuídos em 5 cromossomos, mas apenas 9 codificam autênticas ACS (YAMAGAMI et al., 2003). Em tomate (SEYMOUR et al., 2013) e arroz (ZAREMBINSKI & THEOLOGIS, 1997), o genoma contém 6 e 5, genes anotados como ACS, respectivamente. Essa divergência entre as espécies ainda não foi esclarecida, mas no geral, todas as culturas domesticadas analisadas possuem uma família multigênica para ACS e seus membros compartilham regiões altamente preservadas no núcleo catalítico associadas (ARGUESO et al. 2007) com a estrutura tridimensional (CAPITANI, et al. 1999) , especificidade ao substrato e atividade catalítica (McCARTHY et al., 2001). Embora identificadas anteriormente, na ACS1 somente os domínios 1 e 2 foram observados e para ACS3 nenhuma informação acerca dos sítios conservados foi relatado (LIMA et al., 2011; SÁGIO et al., 2014). Demonstramos neste estudo que todas as ACS de *Coffea arabica* possuem as 7 domínios conservados (Figura 9) encontradas em ACS de outras espécies (KIM et al., 2008; LEE & YOON, 2018; MUÑOZ-ROBREDO et al., 2011) e aminotransferases de *Arabidopsis* (YAMAGAMI et al., 2003).

Uma análise detalhada do alinhamento das isozimas confirmou que os onze resíduos de aminoácidos conservados (MUÑOZ-ROBREDO et al., 2011; YAMAGAMI et al., 2003) estão presentes em todas as sequências de *Coffea arabica*, exceto nas ACS 10 e 12. O resíduo de tirosina (Y), na caixa 2, está ausente na ACS10 e foi substituído por serina (S) na ACS12. Além disso, os resíduos de aspartato (D) e tirosina (Y) foram substituídos por asparagina (N279) e leucina (L282), respectivamente, na ACS10. Taxas de substituições nos sítios desses resíduos também foram observadas com maior frequência nas ACS10 e 12 de soja, maçã, tomate, lúpulos e batata (material suplementar) contribuindo para maior identidade entre essas subfamílias quando comparadas com sequências de outras ACS, inter e intra espécie. Como em *Arabidopsis* (YAMAGAMI et al., 2003), é provável que as proteínas identificadas como ACS 10 e 12 em *Coffea arabica* possam codificar aminotransferases.

A presença do resíduo de tirosina na caixa 2 é fundamental para conformação tridimensional das proteínas ACS (CAPITANI et al., 1999) porque auxilia na ligação do 5-fosfato pirodoxal (PLP) ao sitio da apoenzima ACS: Lisina (K), na caixa 5 (MUÑOZ-

ROBREDO et al., 2011; TSUCHISAKA & THEOLOGIS, 2004a). Esse cofator (PLP) é essencial para as enzimas dependentes do PLP, como as ACS e algumas aminotransferases (ARGUESO et al., 2007). Portanto, entende-se que a ausência da tirosina nesse domínio conservado compromete a atividade catalítica de conversão do AdoMet em ACC mas não compromete outros tipos de catálises, como transaminação e desaminação (ARGUESO et al., 2007). As ACS integram a superfamília das aminotransferases tipos I e II (ARRAES et al., 2015) e a determinação da atividade das isozimas como autênticas ACS requer experimentos adicionais (YAMAGAMI et al., 2003). Mas os resultados obtidos nesse trabalho indicam que a família multigênica ACS em *Coffea arabica*, possivelmente, é formada por apenas 4 membros autênticos com atividade catalítica de ACS: ACS1, ACS2, ACS3 e ACS7.

Figura 9 – Caracterização das sequências protéicas das prováveis enzimas ACS em *Coffea arabica*.



Legenda: Caracterização das sequências protéicas das prováveis enzimas ACS em *Coffea arabica* a partir do alinhamento de sequências de aminoácidos de ACS e aminotransferases de outras espécies. Mtr: *Medicago truncatula*, Ath: *Arabidopsis thaliana*, Car: *Coffea arabica*, Cc: *Coffea canephora*, Zma: *Zea mays*, Sol: *Solanum lycopersicum*, Gb: *Ginkgo biloba*. Os 7 domínios conservados estão marcados em caixas pretas. Os asteriscos indicam os 11 aminoácidos invariantes conservados entre as isoformas de ACS e aminotransferases. O círculo preenchido indica o local de ligação específica ao substrato no resíduo de Glutamato (E).

Fonte: Do autor (2020).

Quanto à capacidade funcional, a deleção de resíduos de aminoácidos pode inativar a atividade da enzima. A ausência do tripeptídeo PSN (caixa 4) em ACS1 de *Arabidopsis* tornou essa sequência um pseudogene que codifica um polipeptídeo não funcional (YAMAGAMI et al., 2003). Logo, conclui-se que a ausência de deleções nos resíduos conservados em todas as 7 caixas de *Coffea arabica* indica que essas sequências são enzimaticamente ativas (EL-SHARKAWY et al., 2008; LEE & YOON, 2018; MUÑOZ-ROBREDO et al., 2011), ou seja, sequências gênicas funcionais para codificar ACS. O resíduo de glutamato (E) na caixa 1 é responsável pela especificidade do substrato (McMACTENEY et al., 2001) e está presente em todas as ACS de *Coffea arabica*, exceto na ACS12. Mas substituição nesse resíduo não implica, necessariamente, em ausência de especificidade porque há evidências de que a presença do glutamato não determina o tipo de atividade catalítica da enzima (YAMAGAMI et al., 2003). Outro indício para essa afirmação é o fato da ACS10 em *Coffea arabica* possuir o resíduo E mas apresentar maior similaridade com ATases, como discutido anteriormente.

As autênticas ACS são agrupadas em 3 tipos distintos com base na presença ou ausência de resíduos de serina (S) para fosforilação na região C-terminal das sequências proteicas (HYUN & KIEBER, 2005; YOSHIDA et al., 2005). O gene ACS1 de *Coffea arabica* codifica proteína ACS com terminal C mais longo e com locais de fosforilação para as proteínas cinase dependentes de cálcio (CDPK) e proteínas cinase ativadas por mitógeno (MAP cinase) e por isso pode ser agrupada no tipo 1 (LIU & ZHANG, 2004; SEBASTIÀ et al., 2004). A ausência de local alvo para fosforilação nas proteínas ACS que também possuem a extensão C-terminal mais curta são classificadas como tipo 3 (EL-SHARKAWY et al., 2008; LIU & ZHANG, 2004; TUCKER et al., 2010) e as ACS2, ACS3 e ACS7 de *Coffea arabica* possuem estrutura semelhante a essa. Quando as proteínas ACS possuem sítios para ligação exclusiva das proteínas CDPK e o terminal C mais curto, são denominadas do tipo 2 (ARGUESO et al., 2007; WANG et al., 2004)., mas *Coffea arabica* não possui ACS com essas características. Considerando a análise de sequência (Figura 10), provavelmente, as proteínas ACS tipo 3 são mais abundantes em *Coffea arabica* assim como em *Oryza sativa* (LEE & YOON, 2018).

Figura 10 – Identificação dos tipos de ACS nas prováveis isozimas de *Coffea arabica* com base nos locais de fosforilação nas sequências de aminoácidos de outras espécies.

<i>MtrACS1</i>	387	E	T	V	E	I	A	L	O	R	I	A	F	V	G	-----	K	E	T	K	K	K	I	E	V	K	R	W	I	N	L	S	L	S	F	T	S	T	F	D	E	N	V	L	S	P	H	N	H	I	I	S	P	S	L	V	R	A	-----	479								
<i>AthACS1</i>	385	D	L	O	I	A	L	E	R	I	D	F	V	V	G	D	R	A	N	K	N	K	N	C	N	C	I	C	N	N	K	R	E	N	K	K	R	K	S	F	Q	N	L	K	L	S	L	S	S	M	Y	E	E	H	V	R	S	P	K	-----	488							
<i>CarACS2</i>	378	E	L	E	I	A	L	K	R	I	T	I	F	I	Q	A	T	E	K	-----	N	O	M	-----	430																																											
<i>CcACS1</i>	379	A	T	L	E	I	A	L	K	R	I	T	I	F	I	Q	A	T	V	K	-----	K	S	D	V	P	A	K	K	S	K	Q	W	Q	K	N	L	R	L	S	F	S	G	S	R	C	E	Y	E	E	S	L	K	S	P	S	V	M	S	P	H	S	F	-----	471			
<i>CarACS1</i>	380	E	S	V	R	V	A	L	R	I	H	K	F	V	L	V	O	G	K	-----	A	T	E	T	T	T	K	S	R	C	S	S	K	L	Q	L	S	L	S	F	R	L	D	E	R	V	M	S	H	-----	469																	
<i>ZmaACS1</i>	388	D	T	M	E	V	A	L	D	R	I	R	F	V	R	O	H	O	H	-----	S	K	A	K	A	E	R	W	A	A	T	R	L	L	S	L	S	L	R	R	G	A	T	A	S	H	L	A	I	P	S	P	L	A	L	L	S	R	O	S	P	M	V	H	A	S	-----	485
<i>CarACS3</i>	384	E	T	L	D	L	A	M	O	R	I	D	F	V	V	S	T	A	T	-----	K	S	N	T	G	R	S	H	L	S	I	Y	S	A	R	K	S	L	S	H	W	F	R	L	S	F	-----	463																				
<i>SoiACS3</i>	384	D	T	L	N	I	A	I	O	R	L	A	F	V	D	S	R	V	N	-----	N	K	D	D	I	Q	N	Q	Q	C	S	I	-----	467																																		
<i>CarACS7</i>	379	R	L	E	I	A	L	O	R	I	H	D	F	M	-----	-----	423																																																			

Legenda: Mtr: *Medicago truncatula*, Ath: *Arabidopsis thaliana*, Car: *Coffea arabica*, Cc: *Coffea canephora*, Zma: *Zea mays*, Sol: *Solanum lycopersicum*. Os asteriscos (*) indicam os locais de fosforilação da cinase representados pelo resíduo de serina “S”. A caixa rosa representa os locais de fosforilação alvo para as CDPK e a caixa azul, os locais de fosforilação alvo para a proteína MAPK.
Fonte: Do autor (2020).

A distribuição das isozimas de ACS em cada tipo é divergente entre as espécies (ARRAES et al., 2015; EL-SHARKAWY et al., 2008; LEE & YOON, 2018; MENG et al., 2014) mas há alguns anos relatos indicaram que todas as proteínas agrupadas nos tipos 1 e 2 são reguladas pós transcricional e /ou pós-traducionalmente (CHAE et al., 2003; TATSUKI & MORI, 2001; YOSHIDA et al., 2005). A presença de sítios alvo para atuação das CDPK ou MAP cinase, como a MPK6 em *Arabidopsis thaliana*, confere a capacidade de regulação dos níveis de etileno em resposta a sinais endógenos e ambientais (DU et al., 2014; LEE et al. 2017; LIU & ZHANG, 2004). Esse controle da biossíntese do etileno via mecanismo de fosforilação é possível porque a estabilidade das proteínas ACS pode ser controlada por enzimas quinase. Quando não fosforiladas, as ACS tipo 1 e 2 tornam-se alvos de degradação via proteassoma 26S. A estabilidade da enzima desempenha um papel importante no potencial de catalise pois aumenta o acúmulo dessas proteínas e isso influencia a taxa de produção do hormônio (JOO et al. 2008; WANG et al. 2004; YOSHIDA et al. 2005). Curiosamente, a CarACS1 possui apenas dois locais de fosforilação para MAP cinase. Possivelmente, a presença desses sítios na porção C-terminal é mais importante do que a quantidade dos resíduos de serina disponíveis, porque foi sugerido (JOO et al., 2008) que o status da fosforilação é o fator mais importante na regulação da estabilidade das ACS desse tipo. É interessante notar que o mecanismo de fosforilação é essencial para atividade catalítica de algumas ACS mas parece dispensável para as ACS tipo 3. De acordo com (HYUN & KIEBER, 2005), a falta de locais para fosforilação nesse grupo sugere que essas sequências codificam proteínas ACS mais estáveis.

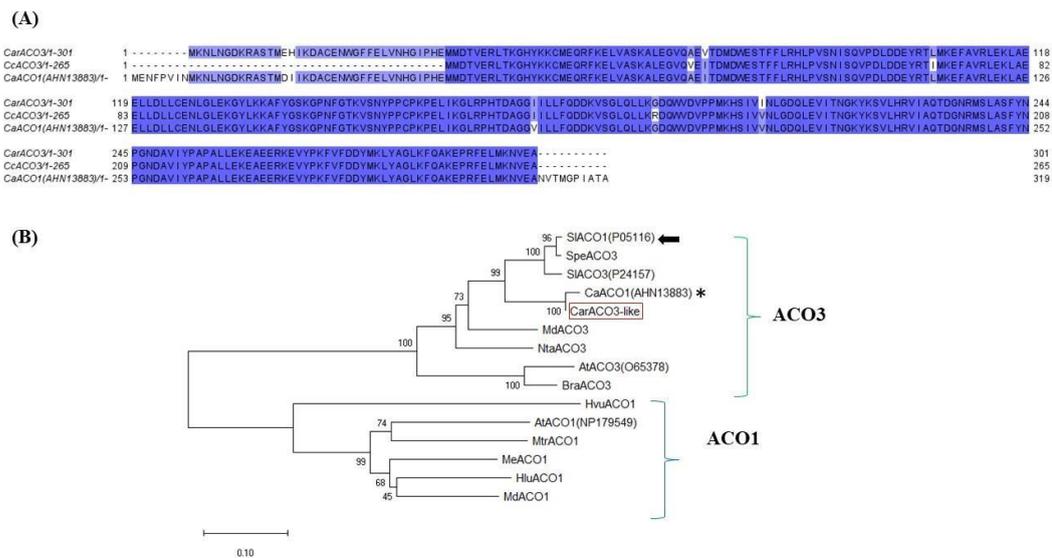
3.1.2 Família dos genes ACO

Diferentemente da ACS, um maior número de genes associados com a codificação da ACO foi identificado em *Coffea arabica* estudo anterior (SÁGIO et al., 2014) e depositado na base de dados genBank NCBI. De acordo com os autores, 3 membros compõem essa família gênica: *CaACO1-like* (acesso: AHN13883), *CaACO4-like* (acesso: AGM48542) e *CaACO5-like* (acesso: KF975696). No nosso estudo, seguimos o perfil de comparação adotado para as outras enzimas e identificamos possíveis genes na pesquisa de similaridade com sequências de

diversas espécies: *CarACO3*, *CarACO4* e *CarACO5*. Observamos que os 3 genes identificados aqui clusterizaram com seu progenitor, *Coffea canephora* (Figura Suplementar 2).

Foram determinadas as sequências proteicas e verificamos que o maior grau de identidade entre elas corresponde a 82%, valor abaixo do estipulado para sequências altamente homólogas nesse estudo (acima de 95%). Um ponto importante é a ausência do gene *ACO1* na nossa pesquisa de similaridade e, a partir disso, fizemos a análise comparativa entre os possíveis genes identificados aqui e os genes identificados anteriormente. Descobrimos que *CarACO3* possui 98,3% de identidade com o *CaACO1-like* (SÁGIO et al., 2014) e ambos possuem 98,1% e 98,4% de identidade com a sequência do *ACO3* de *Coffea canephora* (*CcACO3*) (Figura 11A). No estudo de Ságio et al (2014), a análise filogenética com sequências homólogas de *Solanum lycopersicum* mostraram elevado grau de similaridade entre *SolACO1* e *SolACO3*, e a sequência proteica do gene *ACO1* identificada pelos autores em *Coffea arabica* clusterizou com ambas. A figura 11B mostra a árvore filogenética com as sequências de proteína *SolACO1*, *SolACO3*, *AtACO1* e *CaACO1* utilizadas por Ságio et al (2014) e as sequências preditas nesse estudo. As sequências das prováveis isozimas formam clados específicos, mas *SolACO1* (seta preta) e *CaACO1*(*) não agrupa com as *ACO1* de outras espécies e possivelmente o equívoco na anotação ocorreu nessa clusterização. Portanto, a sequência *CaACO1*(AHN13883) foi renomeada ao longo desse trabalho para *ACO3* (caixa vermelha).

Figura 11 – (A) Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas *CarACO3*, *CcACO3* e *CaACO1* (*) geradas pelo programa ClustalX.



Legenda: Resíduos idênticos entre as três sequências estão em azul escuro e resíduos idênticos apenas entre duas sequências estão em azul claro. Linha tracejada indica perda de resíduos (*gaps*). (B) Análise filogenética de provável membro da via de biossíntese de etileno em *Coffea arabica* (caixa vermelha) e sequências homólogas de *Arabidopsis thaliana* (*At*) e *Solanum lycopersicum* (*Sl*) utilizadas por Ságio

et al (2014). Árvore construída seguindo o modelo de comparação *neighbor-joining* (SAITOU; NEI, 1987) com 5000 randomizações.
Fonte: Do autor (2020).

Por outro lado, *CarACO4* e *CaACO4-like* são 100% idênticas sugerindo que existe apenas uma região no genoma que codifica para ACO4, não existindo variante para esse homólogo. Em relação ao ACO5, a sequência identificada nesse trabalho obteve 100% de identidade com outras ACO5 de café preditas e depositadas no NCBI mas o alinhamento com *CaACO5-like* (KF975696) mostrou identidade abaixo de 50%, sugerindo que pode haver mais de uma região genômica codificando proteínas ACO5.

Várias sequências ortólogas foram encontradas, mas o número de membros na família ACO parece bem variável entre as espécies (HOUBEN & VAN DE POEL, 2019) utilizaram a sequência da ACO1 de maçã (DILLEY et al., 2013), verificada funcionalmente, e identificaram 5 membros da ACO para *Arabidopsis*, 7 para maçã e tomate, 9 para arroz e 13 para o milho. Contudo, até o momento, apenas 5 genes ACO (*LE-ACO1-5*) em tomate (*Lycopersicon esculentum*) são funcionalmente verificados. Nessa espécie foram realizados os estudos pioneiros sobre 1-aminociclopropano-1-oxidase, produzindo os primeiros resultados acerca da regulação da biossíntese de etileno ao nível da ACO (BARRY et al., 1996; HAMILTON et al., 1990; NAKATSUKA et al., 1998; SELL & HEHL, 2005). A família gênica dessa espécie é, talvez, a melhor caracterizada e extensivamente estudada ao longo dos anos. Por esse motivo, é frequente o uso desses genes como parâmetro para identificação de novas sequências de ACO, como fizemos nas nossas consultas ao utilizar sequências de ACO3-4 de *Solanum lycopersicum* (sinônimo de *Lycopersicon esculentum*) como padrão comparativo para determinar que a família multigênica do ACO em *Coffea arabica* é composta por 3 membros: *CarACO3-5-like*. Permanece questionável a autenticidade dessas sequências preditas como enzimas oxidases do ACC, porque a ACO faz parte de uma das maiores famílias de enzimas das plantas (KAWAI et al., 2014) que possui elevada versatilidade de reações (FARROW & FACCHINI, 2014). O principal receio da comunidade científica quanto as análises *in silico* é a superestimação das famílias gênicas (CLOUSE & CARRARO, 2014), porém a análise estrutural refinada das sequências proteicas, como adotado aqui, é um excelente ponto de partida para identificar possíveis genes.

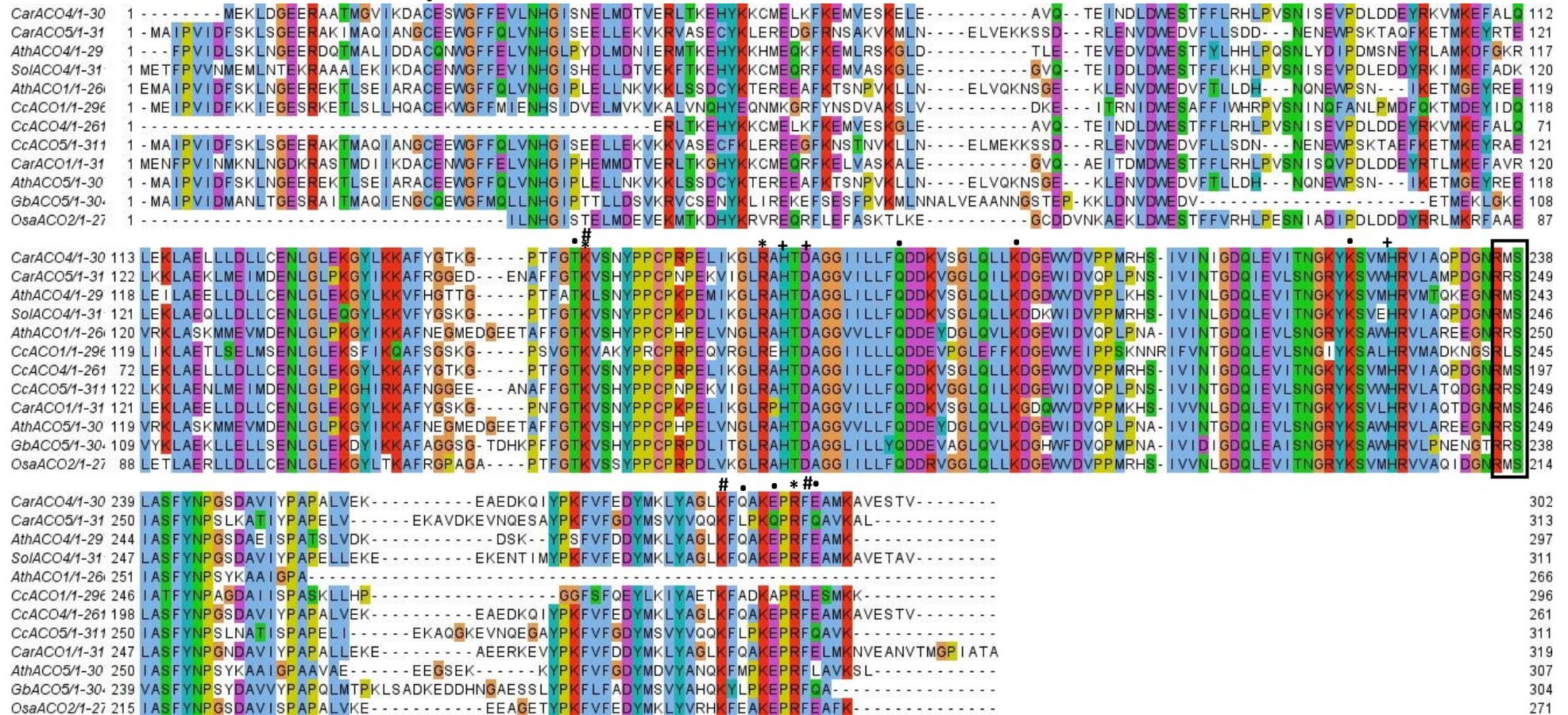
Recentemente, genes ACO foram identificados com base em pesquisa de similaridade comparando os domínios de ligação ao ferro e ao 2-oxoglutarato (TU et al., 2019). Abordagem semelhante foi adotada há alguns anos pelos autores que identificou os possíveis genes ACOs em *Coffea arabica* (SÁGIO et al., 2014) e os resíduos de aminoácidos foram identificados nas

sequências de ACO de café baseados no trabalho de (TANG et al., 1993). Essas proteínas foram agrupadas na superfamília ferro-ascorbato oxidase (SÁGIO et al., 2014), porém os resíduos de ligação ao ascorbato e ao bicarbonato não foram relatados. Aqui, focamos na análise estrutural refinada das sequências com base em estudos mais atuais (DILLEY et al., 2013; SUN et al., 2017; TU et al., 2019) e demonstramos que os polipeptídeos ACO de *Coffea arabica* contém os 15 resíduos conservados no sítio catalítico encontrados nas sequências caracterizadas funcionalmente como verdadeiras ACO (DILLEY et al., 2013; SUN et al., 2017; YOO et al., 2006), e não 12 resíduos como mostrado anteriormente (SÁGIO et al., 2014).

Na figura 12 o alinhamento múltiplo destaca os resíduos essenciais para atividade da ACO e daqui em diante, todos os resíduos relatados como conservados e suas posições são baseados na identificação primária realizada na sequência proteica da ACO1 de *Malus domestica* (DILLEY et al., 2013; SHAW et al., 1996). Os resíduos R244 e S246 compõem o motivo RXS para a ligação do 2-oxoglutarato (2OG) e essa região é conservada em todas as enzimas que integram a superfamília oxigenase/oxidase dependente de Fe^{+2} / 2-oxoglutarato (2OGD) (BRISSEON et al., 2012; CLIFTON et al., 2006; SEO et al., 2004). O resíduo intermediário ao motivo RXS é o fator para classificação das ACO em três diferentes grupos, embora ainda não se tenha explicação para essa variação e se influencia a funcionalidade da enzima (HOUBEN & VAN DE POEL, 2019). Nesse parâmetro, *CarACO3* e *CarACO4* são agrupadas no tipo I porque X = Metionina e *CarACO5* é agrupada no tipo III porque X = Arginina. Portanto, *Coffea arabica* não possui ACO tipo II, onde X = Leucina / Isoleucina. Apesar da presença do motivo RXS, as 3 ACOs de *Coffea arabica* possuem os resíduos K292, K158, F300 (DILLEY et al., 2013) para a ligação do ascorbato que atua como redutor para ativar a catálise do anel do ACC (HAUSINGER, 2004; ZHANG et al., 2004). A presença de sítios altamente conservados para esse cofator em *Coffea arabica* sugere que essa espécie pode compor um grupo exclusivo dentro das 2OGD que não utiliza 2OG para suas reações de catálise mas possivelmente emprega o ascorbato para essa função (JOHN, 1997; KAWAI et al., 2014).

Além disso, as isozimas de arábica abrigam no núcleo catalítico a tríade 2-His-1-carboxilato, motivo composto por duas histidinas ligadas a Asp ou Glu, como doadora do grupo do ácido carboxílico (HEGG & JR, 1997). Esse motivo é essencial para a ancoragem do íon ferroso (Fe^{+2}) no local ativo (MIRICA & KLINMAN, 2008). Demonstramos que todas as proteínas ACO do cafeeiro arábica possuem a tríade catalítica com o grupo carboxilato fornecido pelo Aspartato, ou seja, 2-His-1-Asp.

Figura 12 – Caracterização da família do gene ACO em *Coffea arabica* (Car).



Legenda: Alinhamento da sequência de aminoácidos de polipeptídeo ACO de *Arabidopsis thaliana* (Ath), *Oryza sativa* (Osa), *Ginkgo biloba* (Gb), *Coffea canephora* (Cc), *Solanum lycopersicum* (Sol). As sequências foram alinhadas no ClustalX e os resíduos importantes marcador de acordo: Resíduo de ligação do Fe (+), Resíduo de ligação do Bicarbonato (*), Resíduo de ligação do Ascorbato (#), Motivo RXXS (caixa preta). Os resíduos de aminoácidos com círculos pretos foram conservados entre as espécies e são essenciais para atividade da enzima.

Fonte: Do autor (2020).

Esses aminoácidos são relatados desde o princípio como sítios indispensáveis para atividade da enzima (SHAW et al., 1996) e por isso é altamente conservado em ACOs funcionalmente verificadas em outras espécies (BIDONDE et al., 1998; CHEN et al., 2016; GÓMEZ-LIM et al., 1993; SUN et al., 2017; ZHANG et al., 2004), porque é essencial para a ligação do ACC (MARTINEZ & HAUSINGER, 2015). O complexo enzimático da ACO é completado pela ancoragem do cofator bicarbonato (HCO^{-3}) aos resíduos R175, R99, K158 (DILLEY et al., 2013; ZHANG et al., 2004) auxiliando na estabilidade da ligação entre o Fe^{+2} e o ACC (BRISSEON et al., 2012). Na ausência de bicarbonato, a ACC oxidase não é capaz de oxidar o ACC e formar etileno (ROCKLIN et al., 2004), logo a identificação desses sítios em *Coffea arabica* assegura que o complexo ativo da ACO está apto para ligação do HCO^{-3} e para orientação do oxidante ao substrato principal da reação, ACC. Os resíduos C28, T157, Q188, K199, K230 são altamente conservados em todas as CarACO e estão associados com a estabilidade e atividade catalítica da enzima (DILLEY et al., 2013).

No entanto, os resíduos de glutamato (E) apresentaram a maior taxa de substituição dentre os 15 resíduos descritos como conservados (DILLEY et al., 2013). Entre as espécies comparadas neste estudo (figura 12), o E294 foi detectado apenas em arroz (*Oryza sativa*), mostrando baixo nível de conservação e isso já foi demonstrado para outras espécies (HOUBEN & VAN DE POEL, 2019; YOO et al., 2006), indicando que a substituição do resíduo de glutamina nessa posição, nos três tipos de ACO (HOUBEN & VAN DE POEL, 2019), é aceitável e parece não comprometer a conversão do ACC em etileno. Possivelmente, o local ativo em qualquer um dos resíduos de glutamato é mais importante para a atividade da enzima do que a presença dos 3 sítios, como discutido para os alvos da fosforilação das ACS (JOO et al., 2008). Na isoforma 5 de Arábica, E297 foi substituído por glutamina (Q) e essa alteração foi observada em outras sequências de ACO5 analisadas no resíduo E301. Supostamente, a glutamina pode exercer função semelhante ao glutamato e contribuir para a estabilidade/atividade dessa enzima, uma vez que, a caracterização funcional confirmou que sequência proteicas de *Arabidopsis* (SUN et al., 2017), tomate (BIDONDE et al., 1998) e maçã (DILLEY et al., 2013) continuaram exercendo atividade de autênticas ACO apesar da substituição em algum dos resíduos de glutamato.

Embora ensaios de recombinação para determinação da atividade funcional não tenham sido abordados aqui, nossa análise estrutural mostra que os genes *CarACO3-like*, *CarACO4-like* e *CarACO5-like* de *Coffea arabica* possuem potencial para codificar proteínas ACOs com atividade enzimática de autênticas ACC oxidase. Fornecemos informações detalhadas sobre as possíveis interações entre os resíduos de aminoácidos e as moléculas utilizadas para manter a

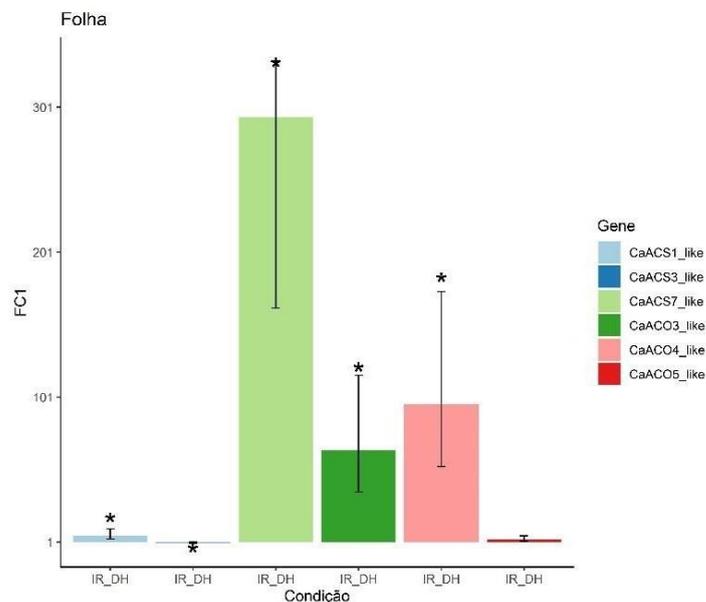
estabilidade e estimular a atividade da enzima 1-aminociclopropano-1-oxidase. Em conjunto, essas observações confirmam que as 3 isozimas contribuíram, de forma variável, para o processo de formação do etileno durante a maturação dos frutos do cafeeiro como mostrado por (SÁGIO et al., 2014).

3.2 Análise da expressão gênica

Em folhas, os genes homólogos da ACS, *CarACS1-like* e *CarACS7-like* foram regulados positivamente em condição bem irrigada, ou seja, inibidos pelo déficit hídrico (Figura 13). O nível de expressão foi 5,5 e 294,3 vezes maior, respectivamente, em plantas bem irrigadas (-0,35 MPa). Observando esses valores supõe-se que *CaACS7-like* é o homólogo dos genes ACS mais expresso em folhas. Entretanto, a diferença nos valores das estimativas desses genes deve-se, na verdade, a discrepância entre os tratamentos para cada gene. O gene *CaACS7-like* foi mais sensível a condição de déficit hídrico, obtendo expressão tardia (Cq – 37) em relação as folhas do tratamento irrigado (Cq – 30). Quando a expressão do *CaACS1-like* é analisada, folhas irrigadas possuem Cq 25 enquanto no déficit hídrico o Cq é 28. Logo, não se pode afirmar que *CaACS7-like* é mais expresso que o *CaACS1-like* mas pode-se inferir que *CaACS7-like* é mais afetado pela limitação hídrica. O homólogo *ACS1* de *Coffea arabica* foi identificado em estudo anterior (SÁGIO et al., 2014) e apresentou nível de expressão similar em folhas de mudas bem irrigadas e sob déficit hídrico (LIMA, 2015). Esse resultado difere do perfil de expressão que obtivemos no nosso estudo, mas deve-se enfatizar que, embora os ensaios tenham sido conduzidos em ambiente semicontrolado com a mesma espécie e cultivar, a disparidade na idade das plantas é um fator considerável. Inicialmente, essa informação parece óbvia, mas é um bom exemplo de comportamento diferencial dos membros de famílias gênicas que são regulados a nível transcricional dependente da fase de desenvolvimento da planta (WANG et al., 2002; TSUCHISAKA & THEOLOGIS, 2004b). Nesse caso, além da diferença na idade tem-se a diferença na fase fenológica, mas ficou evidente que o gene ACS1 é menos sensível ao déficit hídrico no tecido foliar.

Resposta oposta foi verificada para o gene *CarACS3-like* (Figura 13). Ele foi o único homólogo de ACS analisado que apresentou regulação negativa em plantas irrigadas, demonstrando resposta ao déficit de água. Tal informação é importante ao considerar que o *pool* de ACC nas folhas durante o período seco possivelmente é suprido pela isoforma da ACS3. Considerando a hipótese de LIMA (2015), uma vez produzido, e após reidratação, é possível que o ACC sintetizado nas folhas pela ACS3 sejam transportados para as gemas, contribuindo para o aumento nos níveis de etileno nos órgãos florais.

Figura 13 – As estimativas de mudança de dobra (FC) para cada contraste nos tratamentos Irrigado (IR) e Déficit Hídrico (DH) em folha.



Legenda: As estimativas de mudança de dobra (FC) para cada contraste nos tratamentos Irrigado (IR) e Déficit Hídrico (DH) são apresentadas para os genes *CaACS1-like*, *CaACS3-like*, *CaACS7-like*, *CaACO3-like*, *CaACO4-like*, *CaACO5-like* em folhas de *Coffea arabica*. As barras representam o intervalo de confiança em que os contrastes que incluem o valor 1 não são significativas em $\alpha = 5\%$ ($n = 3$). O asterisco (*) significa diferença significativa.

Fonte: Do autor (2020).

Em relação aos genes *ACO*, *CarACO3-like* ($Cq = 17$) e *CarACO4-like* ($Cq = 13$) tiveram nível de expressão 64,1 e 96 vezes maior, respectivamente, em folhas bem irrigadas (Figura 13). A explicação para os valores elevados dessas estimativas adota o mesmo princípio discutido para *CarACS7-like*. Já para *CarACO5-like*, embora também regulado positivamente, não houve diferença significativa entre os tratamentos indicando que a modulação na expressão desse gene não está condicionada à alteração na disponibilidade de água. Em síntese, o status hídrico da planta regula a expressão dos genes *CarACO3-like* e *CaACO4-like* nesse órgão, e provavelmente são as isoformas 3 e 4 da ACO que controlam a conversão do ACC em etileno nas folhas irrigadas.

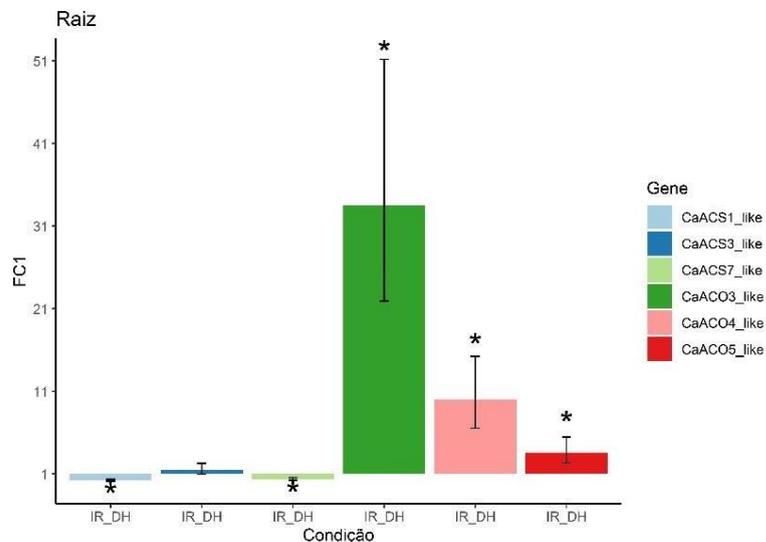
Em condições ambientais ótimas, a exemplo da disponibilidade de água no solo, a síntese de etileno permanece em níveis basais e é suficiente para regular eficientes respostas de crescimento (ABELES & MORGAN, 1992; MÜLLER-DIECKMANN et al., 1999). A orientação dos microtúbulos e o alongamento celular são efeitos biológicos atribuídos ao etileno em baixas concentrações (CHEN et al., 2013; MA et al., 2008; PEI et al., 2013). Logo, parece contraditório a superexpressão de enzimas formadoras de etileno em plantas bem hidratadas. Porém, se atentarmos para o fato de que o valor da estimativa é obtido em relação aos contrastes

de condição hídrica, é provável que durante a seca esses genes tenham mantido inalterada ou reduzido sua transcrição. Foi visto que o nível de expressão dos genes ACO reduziu sob seca e conseqüentemente, menos etileno foi produzido (LIMA, 2015). Isso seria um indício de que esse pico no nível de expressão é uma resposta induzida pela água, durante a fase de florescimento, reforçando os relatos sobre a importância da água nesse processo (CRISOSTO et al., 1992; GUERRA et al., 2005).

Em raiz, os genes *CarACS1-like* e *CarACS7-like* foram reprimidos em plantas irrigadas (Figura 14) e mostraram perfis de expressão exatamente opostos ao foliar (Figura 13). É sabido, há muito tempo, que muitos sistemas de resposta ao etileno envolvem a expressão diferencial de genes (BLEECKER & KENDE, 2000b; DEIKMAN, 1997). Assim sendo, podemos definir que os homólogos 1 e 7 da ACS são sensíveis ao déficit hídrico e essas isoformas seriam as responsáveis pela produção de ACC na raiz, durante o desenvolvimento das gemas florais no período seco. Além disso, o padrão de expressão é sobreposto, mostrando que esses homólogos trabalham conjuntamente para elevar a concentração de ACC nas raízes de plantas com potencial inferior a -3,0MPa. De acordo com Eum et al (2009), a concentração de ACC é diretamente proporcional ao nível da expressão gênica, e regulação positiva dos genes da síntese de etileno em outras espécies quando submetidas ao déficit hídrico resultou em aumento no conteúdo de ACC nas raízes (GÓMEZ-CADENAS et al., 1996; TUDELA & PRIMO-MILLO, 1992). Embora a atividade da enzima ACS seja regulada ao nível pós-traducional (HYUN & KIEBER, 2005; TATSUKI & MORI, 2001), a regulação positiva dos genes *CarACS1-like* e *CarACS7-like* já é a primeira etapa para conduzir ao aumento na produção do etileno.

Para o *CarACS3-like* não houve diferença significativa entre os tratamentos (Figura 14), mostrando que a expressão desse gene não é modulada pelo status hídrico nesse tecido. No entanto, sua regulação positivamente nas duas condições hídricas sugere que ele pode ser o único homólogo dos genes ACS a manter estável a transcrição dessa enzima contribuindo para produção do ACC nas raízes irrigadas. Uma das funções características do etileno é o crescimento radicular sobre condições favoráveis (FENG et al., 2017; PARK et al., 2018). É importante ressaltar que esse resultado não exclui a possibilidade de haver elevada concentração no *pool* de ACC em tecido radicular de cafeeiros irrigados. O ACC é uma molécula móvel, passível de transporte pelo fluxo de água (GÓMEZ-CADENAS et al., 1996; TUDELA & PRIMO-MILLO, 1992). Então, é presumível que o precursor do etileno seja sintetizado em outros tecidos e transportado para a raiz.

Figura 14 – As estimativas de mudança de dobra (FC) para cada contraste nos tratamentos Irrigado (IR) e Déficit Hídrico (DH) em raiz.



Legenda: As estimativas de mudança de dobra (FC) para cada contraste nos tratamentos Irrigado (IR) e Déficit Hídrico (DH) são apresentadas para os genes *CaACS1-like*, *CaACS3-like*, *CaACS7-like*, *CaACO3-like*, *CaACO4-like*, *CaACO5-like* em raiz de *Coffea arabica*. As barras representam o intervalo de confiança em que os contrastes que incluem o valor 1 não são significativas em $\alpha = 5\%$ ($n = 3$). O asterisco (*) significa diferença significativa.

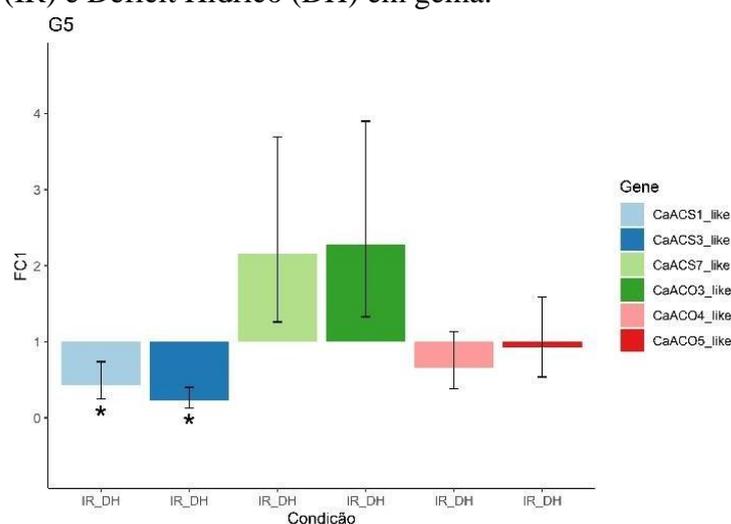
Fonte: Do autor (2020).

Por outro lado, os três genes homólogos da enzima ACO foram diferencialmente expressos entre as condições avaliadas, sendo mais expressos em raízes bem irrigadas mostrando a existência de um perfil de expressão dependente da condição hídrica (Figura 14). O padrão de expressão oposto dos genes das enzimas ACS e ACO nesse estudo evidencia que durante o período seco ocorre um aumento na síntese de ACC regulado pelas isoformas ACS1 e ACS7 e essa molécula permanece acumulada nas raízes, porque o nível de expressão dos genes ACO é fortemente reduzido sob déficit hídrico. Como a enzima ACO tem sido descrita como a etapa regulatória limitante para a biossíntese do etileno (HOUBEN & VAN DE POEL, 2019; RUDUŠ et al., 2013; SHI et al., 2006; VAN DE POEL et al., 2014), supõe-se que a catálise do hormônio foi suprimida com a redução na expressão dos genes de biossíntese da ACO, assim como no estudo de Eum et al (2009). Esses resultados atuam em concordância com hipótese de Lima (2015), quanto ao acúmulo de ACC na raiz do cafeeiro sob seca e a afirmação de Crisosto et al (1992), quanto a existência de moléculas exercendo o papel de sinalizador químico após reidratação.

Em gemas no estágio G5, *CarACS1-like* e *CarACS3-like* foram diferencialmente expressos nas plantas sob déficit hídrico, indicando que o nível de expressão nesse tecido é regulado pelo status hídrico (Figura 15). A fenologia reprodutiva de *Coffea arabica* é dividida

e subdividida de acordo com características das fases de desenvolvimento dos órgãos. Gemas no estágio G5 correspondem ao primeiro estágio após o período de seca, seguido por reidratação, pelo qual as gemas no estágio G4 são submetidas, naturalmente ou de maneira controlada (CAMARGO & CAMARGO, 2001; MORAIS et al., 2008). Assim como observado nas raízes de plantas sob déficit hídrico, o aumento na expressão dos genes da ACC sintase possivelmente também resulta no acúmulo do precursor do etileno nessas gemas. Desse modo, os homólogos 1 e 3 da ACS podem contribuir significativamente para elevação no *pool* de ACC durante o desenvolvimento das gemas, juntamente com o ACC transportados pelo fluxo de água da raiz para parte aérea. Embora regulado positivamente, não houve diferença na expressão do *CarACS7-like* entre as condições de rega. Também não foi observado diferença significativa para os três homólogos da enzima ACO, no entanto *CarACO3-like* foi regulado positivamente e *CarACO4-like* e *CarACO5-like*, negativamente.

Figura 15 – As estimativas de mudança de dobra (FC) para cada contraste nos tratamentos Irrigado (IR) e Déficit Hídrico (DH) em gema.



Legenda: As estimativas de mudança de dobra (FC) para cada contraste nos tratamentos Irrigado (IR) e Déficit Hídrico (DH) são apresentadas para os genes *CaACS1-like*, *CaACS3-like*, *CaACS7-like*, *CaACO3-like*, *CaACO4-like*, *CaACO5-like* em gema G5 de *Coffea arabica*. As barras representam o intervalo de confiança em que os contrastes que incluem o valor 1 não são significativas em $\alpha = 5\%$ ($n = 3$). O asterisco (*) significa diferença significativa.

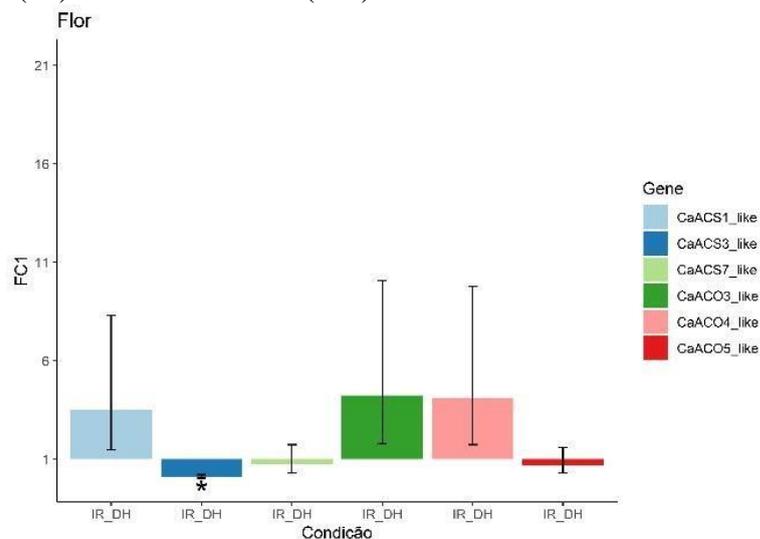
Fonte: Do autor (2020).

Dois genes da biossíntese do etileno (*AtACS2* e *AtACO2*) diferencialmente expressos foram responsáveis por mediar o crescimento e desenvolvimento das pétalas em *Arabidopsis thaliana* (VAN ES et al., 2018), o que já era uma função reconhecida (PEI et al., 2013). A ausência de expressão diferencial em todos os genes da enzima ACO demonstra maior estabilidade na regulação transcricional em comparação com a modulação observada para os

genes da enzima ACS. Durante muito tempo foi pensado que o controle na taxa de síntese do etileno era uma função exclusiva da enzima ACS (ADAMS & YANG, 1979; ARGUESO et al., 2007; YOON, 2015). Atualmente, alguns trabalhos ressaltam que a enzima ACO pode ser o regulador-chave na produção do etileno (CHEN et al., 2016; LOVE et al., 2009; VAN DE POEL et al., 2014), mas nossos resultados mostram que em gemas G5 a expressão da enzima ACO não é responsiva ao déficit hídrico. Um ponto importante nessa observação é considerar que o estímulo para modular a transcrição dos homólogos da ACS e ACO nas gemas G5 não pode ser extrapolado para os outros estádios de desenvolvimento das gemas.

Em flor, *CaCS1-like* e *CaACS7-like* não diferiram entre as condições hídricas (Figura 16). Esse é um perfil de expressão um pouco diferente do encontrado pra gema G5, já indicando que não existe um padrão na biossíntese do etileno mesmo em estruturas que compartilham características similares na escala de desenvolvimento floral.

Figura 16 – As estimativas de mudança de dobra (FC) para cada contraste nos tratamentos Irrigado (IR) e Déficit Hídrico (DH) em flor.



Legenda: As estimativas de mudança de dobra (FC) para cada contraste nos tratamentos Irrigado (IR) e Déficit Hídrico (DH) são apresentadas para os genes *CaACS1-like*, *CaACS3-like*, *CaACS7-like*, *CaACO3-like*, *CaACO4-like*, *CaACO5-like* em flor de *Coffea arabica*. As barras representam o intervalo de confiança em que os contrastes que incluem o valor 1 não são significativas em $\alpha = 5\%$ ($n = 3$). O asterisco (*) significa diferença significativa.

Fonte: Do autor (2020).

A expressão do gene *CarACS3-like* foi induzida em flores durante o déficit hídrico (Figura 16), mantendo o padrão encontrado nas gemas G5 (Figura 15). Logo, percebe-se que a expressão do homólogo 3 da enzima ACS em estruturas reprodutivas pode estar vinculada ao ambiente celular específico de órgãos florais. Foi visto que as isoformas de ACS são bioquimicamente distintas e isso implicaria na atividade biológica específica de tecido

(TSUCHISAKA et al., 2009; YAMAGAMI et al., 2003), justificando a existência de famílias multigênicas para a enzima ACC sintase. A abertura floral no cafeeiro é imediatamente seguida pela formação dos chumbinhos, iniciando a fase de frutificação (MORAIS et al., 2008). Uma preocupação recorrente após a antese é a ocorrência de períodos de seca severa ou prolongada, o que afeta diretamente o vingamento das flores e quantidade de frutos. Durante o desenvolvimento das gemas, condições extremas de seca associadas com altas temperaturas causam o abortamento floral (LEITE et al., 2004; RAMALHO, 2006). Provavelmente, a isoforma ACS3 atue produzindo o ACC necessário para direcionar respostas fisiológicas nas flores.

Quanto aos genes ACO, também não houve diferença quando se comparou os tratamentos. Como descrito anteriormente para as gemas, a análise da expressão dos genes da enzima ACO nas flores reforçam a hipótese de que a concentração das isoformas da ACO são estáveis em estruturas florais, independente da condição hídrica. Pensamos que o ponto central da regulação da biossíntese do etileno em gemas e flores do cafeeiro é regulado pela enzima ACO. A posição prontamente disponível dessa enzima, de acordo com os dados de expressão gênica, pode justificar uma necessidade específica desses órgãos tanto para o desenvolvimento floral quanto vinculado até abertura das flores. Ainda que não seja possível comparar o nível de expressão dos diferentes órgãos analisados neste estudo, podemos observar o perfil de expressão das famílias gênicas. É nítido que a maior variação entre os tratamentos ocorreu para os genes da enzima ACO em folhas e raiz. Portanto, há uma tendência de modulação da transcrição desses genes e parece dependente tanto da condição hídrica quanto do local de ação, culminando em uma possível comunicação entre raiz-parte aérea durante as fases do florescimento de *Coffea arabica*.

Para entender as respostas hormonais é preciso conhecer e integrar múltiplos conjuntos de fatores e, embora estruturalmente simples, o metabolismo do etileno é extremamente complexo. O perfil de expressão do gene *CarACSI-like* foi distinto do que encontramos no nosso trabalho (LIMA, 2015), como discutido anteriormente. Esse padrão de expressão divergente também foi verificado para os genes *CaACO1-like* (renomeado *CarACO3-like*) e *CarACO4-like*. As características específicas e o comportamento de cada espécie quando exposta ao déficit de água são parâmetros relevantes durante a investigação sobre o impacto do estresse hídrico em processos morfológicos e fisiológicos (FORNI et al., 2017; TOMBESI et al. 2018). Aqui, a análise da expressão gênica foi quantificada em tecidos coletados de plantas durante o desenvolvimento floral. A suspensão da irrigação reduziu o potencial foliar ao máximo de -3,0Mpa, enquanto as plantas hidratadas mantiveram o potencial hídrico foliar

superior a -0,4 Mpa. Essas informações são extremamente relevantes quando se busca identificar genes regulados em condições ambientais e de desenvolvimentos específicas.

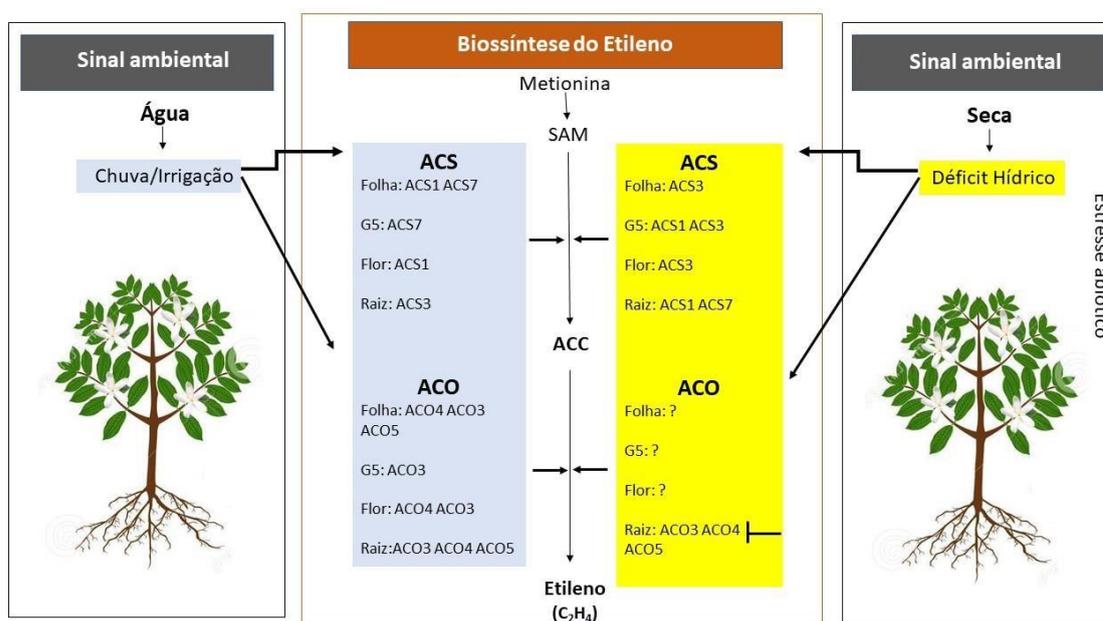
Deve-se enfatizar que os ensaios conduzidos anteriormente (LIMA, 2016; SANTOS, 2016) serviram como um importante modelo para o melhor entendimento do comportamento dos genes do etileno nas respostas induzidas pela modulação no nível da água em *Coffea arabica*. Os resultados gerados por esse autor serviram para embasar a hipótese inicial do nosso estudo, entretanto, não é viável estender essa comparação para inferir o nível de expressão quando, de um lado existem cafeeiros de 4 anos de idade na fase reprodutiva e, do outro lado, cafeeiros na fase vegetativa com 6 meses de idade e potencial hídrico de -4,0Mpa. Ou seja, a imposição de déficit hídrico em uma muda de cafeeiro pode ser interpretada como um evento negativo durante a fase de crescimento, enquanto a imposição de déficit hídrico durante os meses de julho e agosto pode ser compreendida como um evento específico e necessário para a fase reprodutiva da espécie, sobretudo para o desenvolvimento das gemas e preparação para florada. Desse ponto de vista, é aceitável que não tenha ocorrido um padrão na expressão desses genes, já que a análise comparativa da expressão dos 9 polipeptídeos de ACS em *Arabidopsis thaliana* comprovou que as respostas as tensões ambientais podem ocorrer de forma única ou sobreposta, exibindo padrões espaciais e temporais (TSUCHISAKA & THEOLOGIS, 2004a). Nosso resultado de caracterização adicional permite considerar que, provavelmente, o alívio das tensões promovidas por condições limitantes de água nas folhas e raízes de mudas de café podem, também, envolver outros genes da biossíntese do etileno. A rede metabólica desse hormônio se torna ainda mais complexa quando consideramos a capacidade de heterodimerização das isoformas de ACS como um mecanismo para aumentar a versatilidade no controle da biossíntese do etileno, reguladas por diferentes fases de desenvolvimento e interação ambiental (ARGUESO et al., 2007).

Um grande número de estudos descrevem os efeitos do déficit hídrico sobre o metabolismo do etileno e as modificações genéticas, bioquímicas e estruturais que afetam a fisiologia da planta (ARRAES et al., 2015; BELTRANO et al. 1999; ZHANG et al., 2015) O conceito chave para entender os efeitos do etileno dependem do conhecimento sobre o comportamento dos genes, pois apesar da conservação da rota metabólica nos organismos vegetais, a regulação da resposta e os homólogos envolvidos nesse controle é divergente entre as espécies (FORNI et al., 2017; LIN et al., 2009; TOMBESI et al., 2018; TSUCHISAKA & THEOLOGIS, 2004a). Exatamente por isso, espécies agrônomicas importantes já foram estudadas a nível molecular para ampliar a compreensão das respostas promovidas pelo etileno (ARRAES ET AL., 2015; BINNIE & MCMANUS, 2009; NIE et al., 2002; ZAREMBINSKI

& THEOLOGIS, 1997). Foi sugerido que o etileno estaria envolvido na maturação dos frutos de café (PROTASIO et al., 2005). Ságio et al (2014) observaram, previamente, que a expressão dos genes homólogos da enzima ACO é variável em fruto de café (*Coffea arabica*) em diferentes estádios de maturação: *ACO1* e *ACO4* co-expressaram em tecidos de fruto cereja, enquanto a expressão do *ACO5* ocorreu, predominantemente, em tecidos de fruto passa. Foi sugerido, a partir dessa análise, que o etileno pode estar envolvido no amadurecimento dos frutos de café. A possibilidade de climatério no período de maturação no cafeeiro reforça, ainda mais, a necessidade de ampliar e aprofundar o conhecimento sobre o metabolismo do etileno em *Coffea arabica*.

Com os dados do nosso estudo fornecemos um modelo da biossíntese do etileno regulado pelo status hídrico e específica de órgão durante o florescimento de *Coffea arabica*. Nessa esquematização (Figura 17), a ausência de genes em alguns órgãos de cafeeiros submetidos ao déficit hídrico indica que nenhum gene analisado nesse estudo respondeu diferencialmente sob restrição de água. De modo interessante, a regulação na transcrição dos genes das enzimas ACS e ACO suportam as hipóteses sugeridas por Crisosto et al (1992), Lima (2015) e Santos (2016). Cafeeiros sob irrigação constante mantem elevada a expressão dos genes *ACO3* e *ACO4* na raiz. Supondo que o nível de transcritos encontrados aqui seja positivamente correlacionado com a atividade das enzimas, em raízes de cafeeiros irrigados constantemente o ACC produzido é convertido, localmente, em etileno.

Figura 17 – Esquematização do modelo proposto para expressão diferencial dos genes da biossíntese do etileno em *Coffea arabica* durante o florescimento.



Legenda: Genes homólogos da enzima ACS (*CaACS1-like*, *CaACS3-like*, *CaACS7-like*) e da enzima ACO (*CaACO3-like*, *CaACO4-like*, *CaACO5-like*) em folha, gema no estágio G5, flor e raiz. Os genes que não apresentaram diferença significativa entre os contrastes não foram incluídos. Órgãos que possuem interrogação (?) não apresentaram expressão diferencial de nenhum gene analisado nesse estudo. Os genes *ACO* em raiz sob déficit hídrico foram reprimidos.

Fonte: Do autor (2020).

É sabido que o etileno é um composto gasoso (ABELES & MORGAN, 1992), portanto a mobilidade no metabolismo desse hormônio está vinculada ao seu precursor, ACC (TUDELA & PRIMO-MILLO, 1992). Com fluxo de água constante, não há tempo hábil para o gene *ACS3*, na raiz, sintetizar o ACC para ser acumulado. Logo, o aumento nos níveis de etileno na parte aérea foi dependente dos genes *ACS1*, *ACS7*, *ACO3*, *ACO4* e *ACO5*. Possivelmente, cafeeiros constantemente irrigados floresçam em sequência pela disponibilidade contínua da água associada ao etileno, uma vez que, os genes das duas enzimas permanecem regulados positivamente durante a irrigação. Ainda mais interessante é observar que durante o período seco a regulação positiva de todos os genes homólogos da enzima ACO é fortemente suprimida na raiz, enquanto todos os homólogos da enzima ACS são regulados positivamente, especialmente *ACS1* e *ACS7*. Assim, é provável que o ACC produzidos nas raízes durante a seca não seja convertido em etileno. Então, de modo geral, o ACC produzido em cada órgãos pelos específicos genes homólogos da enzima ACS são mantidos nos seus locais de síntese.

Agora, conectando os dois sinais ambientais, é realmente provável que o ACC seja a molécula sinalizadora para antese do cafeeiro (CRISOSTO et al., 1992; LIMA, 2015, SANTOS, 2016). O período de seca entre os meses de julho e agosto seria necessário para estimular a biossíntese do ACC, principalmente nas raízes. Durante esse período, folhas e gemas também são induzidas a produzir o ACC, que permanece acumulado. Com o retorno na irrigação ou da chuva, o impacto repentino da água conduziria o ACC das raízes, pelo xilema, até a parte aérea. O ACC aprisionado nas folhas seriam transportados pelo fluxo da água até as gemas, elevando de forma intensiva e instantânea o *pool* de ACC neste órgão. Deve-se ressaltar que a expressão gênica foi analisada no estágio G5, embora as gemas submetidas á dormência e reidratação estejam no estágio G4. É possível que o gene *ACO3* também atue nas gemas em estágio G4, já que parece ser específico de tecido. Mas, não seria surpresa detectar mais genes homólogos das enzimas ACS e ACO positivamente regulados em G4. Independente do estágio da gema analisada aqui, o mais relevante é a confirmação que existe uma modulação na expressão dos genes das duas principais enzimas da via de biossíntese do etileno pelo status hídrico, integrando as reações isoladas que acontecem entre o sistema radicular e a parte aérea de *Coffea arabica*.

Embora o conceito biológico para a existência de famílias multigênicas ainda não esteja definido, foi postulado que a diferença na composição química das células, tecidos e órgãos pode influenciar na especificidade da expressão dos homólogos (ROTTMANN et al., 1991; YAMAGAMI et al., 2003). De modo geral, esses resultados enfatizam que a existência de famílias multigênicas não é um mecanismo redundante. E mais, que a especificidade entre gene-órgão-estresse possivelmente poderia acarretar em perda de função em situação de nocaute gênico, a exemplo dos genes *CarACS3-like* em flores e *CarACS1-like* e *CarACS3-like* em gemas G5, ambas sob déficit hídrico. O controle transcricional dos membros das famílias multigênicas das enzimas ACS e ACO são um dos pontos de regulação da síntese do etileno (ARGUESO et al., 2007) e dominar os conhecimentos teóricos fornece subsídios para a execução de pesquisas básicas sobre os genes responsáveis por codificar enzimas da via de síntese do etileno e determinar o local e o estímulo para expressão diferencial (RUDUŠ et al., 2013). Com as informações geradas aqui, é possível direcionar pesquisas futuras com genes da biossíntese do etileno específicos para estudo do florescimento do cafeeiro, assim como relatado que a superexpressão do gene *ACO1* em cártamo estimulou a via de biossíntese de flavonoides, uma descoberta interessante para estudos focados na melhoria da produção de oleaginosas (TU et al., 2019).

4 CONCLUSÕES

Nesse estudo, ampliamos e aprimoramos o conhecimento sobre os membros da via de biossíntese do etileno em *Coffea arabica*. Descobrimos que a enzima ACS pode ser codificada por uma pequena família multigênica de 4 membros (*CaACO1-like*, *CaACO2-like*, *CaACO3-like*, *CaACO7-like*) e que a família ACO manteve os 3 genes identificados desde a análise anterior, mas agora possui um membro renomeado para *CaACO3-like*. Também fornecemos a primeira definição sobre o comportamento dos genes homólogos e definimos que existe padrão de expressão único e sobreposto, dependente do órgão e da condição hídrica. Interessantemente, os genes *ACO* em cafeeiros sob déficit hídrico não apresentaram expressão diferencial em folhas, gemas G5 e flores, e foram reprimidos nas raízes. Essa informação contribui para o desenvolvimento de pesquisas direcionadas à rota de biossíntese do etileno nessa espécie e oferece uma excelente oportunidade para aprimorar o estudo da comunicação entre raiz-parte aérea durante o florescimento utilizando genes específicos.

REFERÊNCIAS

- Abeles, F. B., & Morgan, P. W. (1992). Front Matter. *Ethylene in Plant Biology*, iii. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-091628-6.50001-1>
- Abiri, R., Shaharuddin, N. A., Maziah, M., Yusof, Z. N. B., Atabaki, N., Sahebi, M., ... Hanafi, M. M. (2017, February 1). Role of ethylene and the APETALA 2/ethylene response factor superfamily in rice under various abiotic and biotic stress conditions. *Environmental and Experimental Botany*, Vol. 134, pp. 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.10.015>
- Adams, D. O., & Yang, S. F. (1979). Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(1), 170–174. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.1.170>
- Adams, D O, Yang, S. F., & Stumpf, P. K. (1979). *Communicated by* (Vol. 76).
- Adams, Douglas O, Shang, A., & Yang, F. A. (1977). Methionine Metabolism in Apple Tissue IMPLICATION OF S-ADENOSYLMETHIONINE AS AN INTERMEDIATE IN THE CONVERSION OF METHIONINE TO ETHYLENE'. In *Plant Physiol* (Vol. 60). Retrieved from www.plantphysiol.org
- Adams, Douglas O., & Yang, S. F. (1981). Ethylene the gaseous plant hormone: mechanism and regulation of biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. 6, pp. 161–164. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(81\)90059-1](https://doi.org/10.1016/0968-0004(81)90059-1)
- Agrônomo, E. (1997). *DAS VARIEDADES CATURRA E MUNDO NOVO DE EM DO DE PLANTAS POR COVA E DAS PLANTAS. DE BARROS.*
- Albacete, A. A., Martínez-Andújar, C., & Pérez-Alfocea, F. (2014, January). Hormonal and metabolic regulation of source-sink relations under salinity and drought: From plant survival to crop yield stability. *Biotechnology Advances*, Vol. 32, pp. 12–30. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.005>
- Alonso, J. M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S., & Ecker, J. R. (1999). EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. *Science*, 284(5423), 2148–2152. <https://doi.org/10.1126/science.284.5423.2148>
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Solano, R., Wisman, E., Ferrari, S., Ausubel, F. M., & Ecker, J. R. (2003). Five components of the ethylene-response pathway identified in a screen for weak ethylene-insensitive mutants in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), 2992–2997. <https://doi.org/10.1073/pnas.0438070100>
- An, F., Zhao, Q., Ji, Y., Li, W., Jiang, Z., Yu, X., ... Guo, H. (2010). Ethylene-induced stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 is mediated by proteasomal degradation of EIN3 binding F-box 1 and 2 that requires EIN2 in arabidopsis. *Plant Cell*, 22(7), 2384–2401. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.076588>
- Andersson, J. O., & Andersson, S. G. E. (2001). Pseudogenes, Junk DNA, and the Dynamics

of Rickettsia Genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 18(5), 829–839.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003864>

Argueso, C. T., Hansen, M., & Kieber, J. J. (2007, June). Regulation of ethylene biosynthesis. *Journal of Plant Growth Regulation*, Vol. 26, pp. 92–105. <https://doi.org/10.1007/s00344-007-0013-5>

Arraes, F. B. M., Beneventi, M. A., Lisei de Sa, M. E., Paixao, J. F. R., Albuquerque, E. V. S., Marin, S. R. R., ... Grossi-de-Sa, M. F. (2015). Implications of ethylene biosynthesis and signaling in soybean drought stress tolerance. *BMC Plant Biology*, 15(1), 1–20.
<https://doi.org/10.1186/s12870-015-0597-z>

Augusto, B., & Silva, O. (n.d.). *The biannuality of coffee culture and the economic result of storage Article in Custos e Agronegocio · July 2013 CITATIONS 0 READS 68*. Retrieved from www.custoseagronegocioonline.com.br

Balakirev, E. S., & Ayala, F. J. (2003). Pseudogenes: Are They “Junk” or Functional DNA? *Annual Review of Genetics*, 37(1), 123–151.
<https://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.040103.103949>

Barbosa, D., Mandioca, E., Barbosa, D. S. G., Ltda, B., Belan, L. L., Carvalho, E. G., ... Testemunha, M. (n.d.). *Efeito do mathury na uniformidade de maturação do cafeeiro em lavouras de cafeicultura de montanha. d.*

Barbosa Monteiro Arraes, F., Aparecida Beneventi, M., Eugenia Lisei de Sa, M., Felipe Roca Paixao, J., Valeria Saliba Albuquerque, E., Regina Rockenbach Marin, S., ... Fatima Grossi-de-Sa, M. (2015). *Implications of ethylene biosynthesis and signaling in soybean drought stress tolerance*. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0597-z>

Barry, C. S., Blume, B., Bouzayen, M., Cooper, W., Hamilton, A. J., & Grierson, D. (1996). Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. *The Plant Journal*, 9(4), 525–535. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.09040525.x>

Barry, C. S., & Giovannoni, J. J. (2006). Ripening in the tomato Green-ripe mutant is inhibited by ectopic expression of a protein that disrupts ethylene signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(20), 7923–7928.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0602319103>

Basu, S., Ramegowda, V., Kumar, A., & Pereira, A. (2016). Plant adaptation to drought stress [version 1; referees: 3 approved]. *F1000Research*, Vol. 5.
<https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.7678.1>

Beltrano, Ronco, & Montaldi. (1999). Drought Stress Syndrome in Wheat Is Provoked by Ethylene Evolution Imbalance and Reversed by Rewatering, Aminoethoxyvinylglycine, or Sodium Benzoate. *Journal of Plant Growth Regulation*, 18(2), 59–64.
<https://doi.org/10.1007/pl00007049>

Bidonde, S., Ferrer, M. A., Zegzouti, H., Ramassamy, S., Latche, A., Pech, J.-C., ... Bouzayen, M. (1998). Expression and characterization of three tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase cDNAs in yeast. *European Journal of Biochemistry*, 253(1), 20–26.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2530020.x>

- Binnie, J. E., & McManus, M. T. (2009). Characterization of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) oxidase multigene family of *Malus domestica* Borkh. *Phytochemistry*, *70*(3), 348–360. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.01.002>
- Blankenship, S. M., & Dole, J. M. (2003, April 1). 1-Methylcyclopropene: A review. *Postharvest Biology and Technology*, Vol. 28, pp. 1–25. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00246-6](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00246-6)
- Bleecker, A. B. (1999, July 1). Ethylene perception and signaling: An evolutionary perspective. *Trends in Plant Science*, Vol. 4, pp. 269–274. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(99\)01427-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01427-2)
- Bleecker, A. B., Esch, J. J., Hall, A. E., Rodríguez, F. I., & Binder, B. M. (1998). The ethylene-receptor family from *Arabidopsis*: Structure and function. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *353*(1374), 1405–1412. <https://doi.org/10.1098/rstb.1998.0295>
- Bleecker, A. B., & Kende, H. (2000a). Ethylene: A Gaseous Signal Molecule in Plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *16*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.1>
- Bleecker, A. B., & Kende, H. (2000b). ETHYLENE: A Gaseous Signal Molecule in Plants. In *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* (Vol. 16). Retrieved from www.annualreviews.org
- Boller, T., Herner, R. C., & Kende, H. (1979). Assay for and Enzymatic Formation of an Ethylene Precursor, 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid*. In *Planta* (Vol. 145).
- Bouzayen, M., Latché, A., & Pech, J. C. (1990). Subcellular localization of the sites of conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid into ethylene in plant cells. *Planta*, *180*(2), 175–180. <https://doi.org/10.1007/BF00193992>
- Bradford, K. J., & Trewavas, A. J. (1994). Sensitivity thresholds and variable time scales in plant hormone action. *Plant Physiology*, *105*(4), 1029–1036. <https://doi.org/10.1104/pp.105.4.1029>
- Bradford, Kent J. (2008). Shang Fa Yang: Pioneer in plant ethylene biochemistry. *Plant Science*, *175*(1–2), 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.01.005>
- Bradford, Kent J., & Yang, S. F. (1980). Xylem Transport of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid, an Ethylene Precursor, in Waterlogged Tomato Plants. *Plant Physiology*, *65*(2), 322–326. <https://doi.org/10.1104/pp.65.2.322>
- Brisson, L., El Bakkali-Taheri, N., Giorgi, M., Fadel, A., Kaizer, J., Réglie, M., ... Simaan, A. J. (2012). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase: Insight into cofactor binding from experimental and theoretical studies. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *17*(6), 939–949. <https://doi.org/10.1007/s00775-012-0910-3>
- Buer, C. S., Wasteneys, G. O., & Masle, J. (2003). Ethylene modulates root-wave responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *132*(2), 1085–1096. <https://doi.org/10.1104/pp.102.019182>
- Burns, J. K. (2008). 1-Methylcyclopropene applications in preharvest systems: Focus on citrus. *HortScience*, *43*(1), 112–114. <https://doi.org/10.21273/hortsci.43.1.112>

- Bürstenbinder, K., Waduware, I., Schoor, S., Moffatt, B. A., Wirtz, M., Minocha, S. C., ... Sauter, M. (2010). Inhibition of 5'-methylthioadenosine metabolism in the Yang cycle alters polyamine levels, and impairs seedling growth and reproduction in Arabidopsis. *The Plant Journal*, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04211.x>
- Cai, C., Chen, K. S., Xu, W. P., Zhang, W. S., Li, X., & Ferguson, I. (2006). Effect of 1-MCP on postharvest quality of loquat fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *40*(2), 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.12.014>
- Campa, C., Ballester, J. F., Doulebeau, S., Dussert, S., Hamon, S., & Noirot, M. (2004). Trigonelline and sucrose diversity in wild Coffea species. *Food Chemistry*, *88*(1), 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.020>
- Cao, Y.-R., Chen, S.-Y., & Zhang, J.-S. (2008). Plant Signaling & Behavior Ethylene signaling regulates salt stress response. *Plant Signaling & Behavior*, *3*(10), 761–763. <https://doi.org/10.4161/psb.3.10.5934>
- Çelikel, F. G., Dodge, L. L., & Reid, M. S. (2002). Efficacy of 1-MCP (1-methylcyclopropene) and Promalin for extending the post-harvest life of Oriental lilies (*Lilium* × “Mona Lisa” and ‘Stargazer’). *Scientia Horticulturae*, *93*(2), 149–155. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(01\)00331-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(01)00331-4)
- Chae, H. S., Faure, F., & Kieber, J. J. (2003). The eto1, eto2, and eto3 mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in Arabidopsis by increasing the stability of ACS protein. *Plant Cell*, *15*(2), 545–559. <https://doi.org/10.1105/tpc.006882>
- Chalfun Júnior, A., & Horllys Gomes Barreto Coorientador, O. (n.d.). *CARLOS HENRIQUE CARDON IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO FLOWERING LOCUS T (FT) E SUA EXPRESSÃO GÊNICA EM DIFERENTES ESPÉCIES DO GÊNERO COFFEA*.
- Chang, C. (2016a). Q&A: How do plants respond to ethylene and what is its importance? *BMC Biology*, *14*(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0230-0>
- Chang, C. (2016b). Q and A: How do plants respond to ethylene and what is its importance? *BMC Biology*, *14*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0230-0>
- Chang, C., & Bleeker, A. B. (2004). Ethylene biology. More than a gas. *Plant Physiology*, *136*(2), 2895–2899. <https://doi.org/10.1104/pp.104.900122>
- Chang, C., Kwok, S. F., Bleeker, A. B., & Meyerowitz, E. M. (1993). Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: Similarity of product to two-component regulators. *Science*, *262*(5133), 539–544. <https://doi.org/10.1126/science.8211181>
- Chang, C., & Stadler, R. (2001). Ethylene hormone receptor action in Arabidopsis. *BioEssays*, *23*(7), 619–627. <https://doi.org/10.1002/bies.1087>
- Chao, Q., Rothenberg, M., Solano, R., Roman, G., Terzaghi, W., & Ecker, J. R. (1997). Activation of the ethylene gas response pathway in arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell*, *89*(7), 1133–1144. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80300-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80300-1)
- Chen, H., Sun, J., Li, S., Cui, Q., Zhang, H., Xin, F., ... Huang, S. (2016). An ACC Oxidase

Gene Essential for Cucumber Carpel Development. *Molecular Plant*, 9(9), 1315–1327. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.06.018>

Chen, T., Xu, Y., Wang, J., Wang, Z., Yang, J., & Zhang, J. (2013). Polyamines and ethylene interact in rice grains in response to soil droughting during grain filling. *Journal of Experimental Botany*, 64(8), 2523–2538. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert115>

Chen, W., Yin, X., Wang, L., Tian, J., Yang, R., Liu, D., ... Gao, J. (2013). Involvement of rose aquaporin RhPIP1;1 in ethylene-regulated petal expansion through interaction with RhPIP2;1. *Plant Molecular Biology*, 83(3), 219–233. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0084-6>

Cin, V. D., Rizzini, F. M., Botton, A., & Tonutti, P. (2006). *The ethylene biosynthetic and signal transduction pathways are differently affected by 1-MCP in apple and peach fruit*. 42, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.06.008>

Clark, D. G., Gubrium, E. K., Barrett, J. E., Nell, T. A., & Klee, H. J. (1999). Root formation in ethylene-insensitive plants. *Plant Physiology*, 121(1), 53–59. <https://doi.org/10.1104/pp.121.1.53>

Clifton, I. J., McDonough, M. A., Ehrismann, D., Kershaw, N. J., Granatino, N., & Schofield, C. J. (2006, April). Structural studies on 2-oxoglutarate oxygenases and related double-stranded β -helix fold proteins. *Journal of Inorganic Biochemistry*, Vol. 100, pp. 644–669. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.01.024>

Clouse, R. M., & Carraro, N. (2014). A novel phylogeny and morphological reconstruction of the PIN genes and first phylogeny of the ACC-oxidases (ACOs). *Frontiers in Plant Science*, 5(JUN). <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00296>

Conti, V., Mareri, L., Faleri, C., Nepi, M., Romi, M., Cai, G., & Cantini, C. (2019). Drought stress affects the response of italian local tomato (*solanum lycopersicum* L.) varieties in a genotype-dependent manner. *Plants*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/plants8090336>

Crisosto, C. H., Grantz, D. A., & Meinzer, F. C. (1992). Effects of water deficit on flower opening in coffee (*Coffea arabica* L.). *Tree Physiology*, 10(2), 127–139. <https://doi.org/10.1093/treephys/10.2.127>

DaMatta, F. M., Cunha, R. L., Antunes, W. C., Martins, S. C. V., Araujo, W. L., Fernie, A. R., & Moraes, G. A. B. K. (2008). In field-grown coffee trees source–sink manipulation alters photosynthetic rates, independently of carbon metabolism, via alterations in stomatal function. *New Phytologist*, 178(2), 348–357. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02367.x>

Dawood, T., Yang, X., Visser, E. J. W., Te Beek, T. A. H., Kensche, P. R., Cristescu, S. M., ... Rieu, I. (2016). A co-opted hormonal cascade activates dormant adventitious root primordia upon flooding in *solanum dulcamara*. *Plant Physiology*, 170(4), 2351–2364. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00773>

De Camargo, Â. P., & De Camargo, M. B. P. (2001). Definição e Esquematização das Fases Fenológicas do Cafeeiro Arábica nas Condições Tropicais do Brasil. *Bragantia*, 60(1), 65–68.

De Oliveira, E., Da Silva, F. M., Salvador, N., De Souza, Z. M., Chalfoun, S. M., & De

- Figueiredo, C. A. P. (2007). Custos operacionais da colheita mecanizada do cafeeiro. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 42(6), 827–831. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2007000600009>
- de Oliveira, R. R., Cesarino, I., Mazzafera, P., & Dornelas, M. C. (2014). Flower development in *Coffea arabica* L.: New insights into MADS-box genes. *Plant Reproduction*, 27(2), 79–94. <https://doi.org/10.1007/s00497-014-0242-2>
- Deikman, J. (1997). Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene transcription. *Physiologia Plantarum*, 100(3), 561–566. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb03061.x>
- Demirevska, K., Zasheva, D., Dimitrov, R., Simova-Stoilova, L., Stamenova, M., & Feller, U. (2009). Drought stress effects on Rubisco in wheat: Changes in the Rubisco large subunit. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(6), 1129–1138. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0331-2>
- Depaepe, T., & Van Der Straeten, D. (2019). Tools of the Ethylene Trade: A Chemical Kit to Influence Ethylene Responses in Plants and Its Use in Agriculture. *Small Methods*, 1900267. <https://doi.org/10.1002/smt.201900267>
- Depuydt, S., & Hardtke, C. S. (2011, May 10). Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Current Biology*, Vol. 21. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.03.013>
- Dilley, D. R., Wang, Z., Kadirjan-Kalbach, D. K., Ververidis, F., Beaudrought, R., & Padmanabhan, K. (2013). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase reaction mechanism and putative post-translational activities of the ACCO protein. *AoB PLANTS*, 5. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plt031>
- Ditta, G., Pinyopich, A., Robles, P., Pelaz, S., & Yanofsky, M. F. (2004). The SEP4 gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. *Current Biology*, 14(21), 1935–1940. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.10.028>
- Du, H., Wu, N., Cui, F., You, L., Li, X., & Xiong, L. (2014). A homolog of *ETHYLENE OVERPRODUCER*, *O* *ETOL* 1, differentially modulates drought and submergence tolerance in rice. *The Plant Journal*, 78(5), 834–849. <https://doi.org/10.1111/tpj.12508>
- Dubois, M., Van den Broeck, L., & Inzé, D. (2018, April 1). The Pivotal Role of Ethylene in Plant Growth. *Trends in Plant Science*, Vol. 23, pp. 311–323. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.01.003>
- Dubouzet, J. G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E. G., Miura, S., ... Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant Journal*, 33(4), 751–763. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01661.x>
- Dugardeyn, J., Vandenbussche, F., & Van Der Straeten, D. (2007). To grow or not to grow: what can we learn on ethylene-gibberellin cross-talk by in silico gene expression analysis? *Journal of Experimental Botany*, 59(1), 1–16. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm349>
- El-Sharkawy, I., Kim, W. S., Jayasankar, S., Svircev, A. M., & Brown, D. C. W. (2008). Differential regulation of four members of the ACC synthase gene family in plum. *Journal of*

Experimental Botany, 59(8), 2009–2027. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern056>

Elias, R., & Almeida, B. (2013). *Influência Do Uso Do Inibidor De Café Lavras - Mg.*

Ella, L., Zion, A., Nehemia, A., & Amnon, L. (2003). Effect of the ethylene action inhibitor 1-methylcyclopropene on parsley leaf senescence and ethylene biosynthesis. *Postharvest Biology and Technology*, 30(1), 67–74. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(03\)00080-2](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(03)00080-2)

English, P. J., Lycett, G. W., Roberts, J. A., & Jackson, M. B. (1995). Increased 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase activity in shoots of flooded tomato plants raises ethylene production to physiologically active levels. *Plant Physiology*, 109(4), 1435–1440. <https://doi.org/10.1104/pp.109.4.1435>

Eum, H. L., Kim, H. B., Choi, S. B., & Lee, S. K. (2009). Regulation of ethylene biosynthesis by nitric oxide in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit harvested at different ripening stages. *European Food Research and Technology*, 228(3), 331–338. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0938-3>

Fa Yang, S., & Hoffman, N. E. (1984). *ETHYLENE BIOSYNTHESIS AND ITS REGULATION IN HIGHER PLANTS*. Retrieved from www.annualreviews.org

Farrow, S. C., & Facchini, P. J. (2014, October 9). Functional diversity of 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenases in plant metabolism. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00524>

Felipe Alves Moreira Luiz Carlos Trugo, R., & Alberto Bastos De Maria, C. (2000). *COMPONENTES VOLÁTEIS DO CAFÉ TORRADO. PARTE II. COMPOSTOS ALIFÁTICOS, ALICÍCLICOS E AROMÁTICOS* (Vol. 23).

Feng, X., Apelbaum, A., Sisler, E. C., & Goren, R. (2004). Control of ethylene activity in various plant systems by structural analogues of 1-methylcyclopropene. *Plant Growth Regulation*, 42(1), 29–38. <https://doi.org/10.1023/B:GROW.0000014900.12351.4e>

Feng, Y., Xu, P., Li, B., Li, P., Wen, X., An, F., ... Guo, H. (2017). Ethylene promotes root hair growth through coordinated EIN3/EIL1 and RHD6/RSL1 activity in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(52), 13834–13839. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711723115>

Fernandes-Brum, C. N., Garcia, B. de O., Moreira, R. O., Sággio, S. A., Barreto, H. G., Lima, A. A., ... Chalfun-Júnior, A. (2017). A panel of the most suitable reference genes for RT-qPCR expression studies of coffee: screening their stability under different conditions. *Tree Genetics and Genomes*, 13(6), 131. <https://doi.org/10.1007/s11295-017-1213-1>

Ferreira De Mendonça, R., Rodrigues, W. N., Deleon Martins, L., & Tomaz, M. A. (n.d.). *ABORDAGEM SOBRE A BIENALIDADE DE PRODUÇÃO EM PLANTAS DE CAFÉ.*

Force, A., Lynch, M., Pickett, B., Amores, A., Yan, Y.-L., & Postlethwait, J. (1999). *Preservation of Duplicate Genes by Complementary, Degenerative Mutations.*

Forni, C., Duca, D., & Glick, B. R. (2017). Mechanisms of plant response to salt and drought stress and their alteration by rhizobacteria. *Plant and Soil*, 410(1–2), 335–356. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3007-x>

- Franca, A. S., Mendonça, J. C. F., & Oliveira, S. D. (2005). Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. *LWT - Food Science and Technology*, *38*(7), 709–715. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.08.014>
- Franck, N., Vaast, P., Genard, M., & Dauzat, J. (2006). Soluble sugars mediate sink feedback down-regulation of leaf photosynthesis in field-grown *Coffea arabica*. *Tree Physiology*, *26*(4), 517–525. <https://doi.org/10.1093/treephys/26.4.517>
- Fujimoto, S. Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H., & Ohme-Takagi, M. (2000). Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell*, *12*(3), 393–404. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.3.393>
- Galati, V. C., Muniz, A. C. C., Guimarães, J. E. R., Inestroza-Lizardo, C. O., Mattiuz, C. M. F., & Mattiuz, B. H. (2017). Conservação pós-colheita de alstroéméria ‘ajax’ com uso de 1-metilciclopropeno. *Ciencia e Agrotecnologia*, *41*(2), 181–190. <https://doi.org/10.1590/1413-70542017412032816>
- Gallie, D. R., & Young, T. E. (2004). The ethylene biosynthetic and perception machinery is differentially expressed during endosperm and embryo development in maize. *Molecular Genetics and Genomics*, *271*(3), 267–281. <https://doi.org/10.1007/s00438-004-0977-9>
- Gao, Z., Chen, Y.-F., Randlett, M. D., Zhao, X.-C., Findell, J. L., Kieber, J. J., & Schaller, G. E. (2003). Localization of the Raf-like Kinase *CTR1* to the Endoplasmic Reticulum of *Arabidopsis* through Participation in Ethylene Receptor Signaling Complexes*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305548200>
- Gehl, C., Jowkar, M. M., Wagenhaus, J., & Serek, M. (2019). Application of 1-MCP as a liquid formulation prevents ethylene-induced senescence in *Phalaenopsis* orchid flowers and *Kalanchoë blossfeldiana* inflorescences. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *94*(4), 499–506. <https://doi.org/10.1080/14620316.2018.1563510>
- Geisler-Lee, J., Caldwell, C., & Gallie, D. R. (2010). Expression of the ethylene biosynthetic machinery in maize roots is regulated in response to hypoxia. *Journal of Experimental Botany*, *61*(3), 857–871. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp362>
- Gertman, E., & Fuchs, Y. (1972). Effect of Abscisic Acid and Its Interactions with Other Plant Hormones on Ethylene Production in Two Plant Systems. *Plant Physiology*, *50*(1), 194–195. <https://doi.org/10.1104/pp.50.1.194>
- Golding, J. B., Shearer, D., Wyllie, S. G., & McGlasson, W. B. (1998). Application of 1-MCP and propylene to identify ethylene-dependent ripening processes in mature banana fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *14*(1), 87–98. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(98\)00032-5](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(98)00032-5)
- Gómez-Cadenas, A., Tadeo, F. R., Talon, M., & Primo-Millo, E. (1996). Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of Cleopatra mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant Physiology*, *112*(1), 401–408. <https://doi.org/10.1104/pp.112.1.401>
- Gómez-Lim, M. A., Valdés-López, V., Cruz-Hernandez, A., & Saucedo-Arias, L. J. (1993). Isolation and characterization of a gene involved in ethylene biosynthesis from *Arabidopsis*

thaliana. *Gene*, 134(2), 217–221. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90096-L](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90096-L)

Gouveia, N. M. (1984). *Estudo da diferenciação de crescimento de gemas florais de coffea arabica L.: Observações sobre antese e maturação dos frutos* (p. 237). p. 237.

Graham, L. E., Schippers, J. H. M., Dijkwel, P. P., & Wagstaff, C. (2018). Ethylene and Senescence Processes. In *Annual Plant Reviews online* (pp. 305–341). <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0484>

Gray, W. M. (2004, September). Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biology*, Vol. 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020311>

Grbic, V., & Bleeker, A. B. (1995). Ethylene regulates the timing of leaf senescence in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 8(4), 595–602. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1995.8040595.x>

Guan, R., Zhao, Y., Zhang, H., Fan, G., Liu, X., Zhou, W., ... Chen, W. (2016). Draft genome of the living fossil Ginkgo biloba. *GigaScience*, 5(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s13742-016-0154-1>

Guerra, A., Rocha, O., Rodrigues, G., Sanzonowicz, C., Sampaio, J., Silva, H., & Araújo, M. (2005). *Irrigação do cafeeiro no cerrado: estratégia de manejo de água para uniformização de florada*.

Guillén, F., Castillo, S., Zapata, P. J., Martínez-Romero, D., Serrano, M., & Valero, D. (2007). Efficacy of 1-MCP treatment in tomato fruit. 1. Duration and concentration of 1-MCP treatment to gain an effective delay of postharvest ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 43(1), 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.07.004>

Guo, H., & Ecker, J. R. (2004). The ethylene signaling pathway: New insights. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol. 7, pp. 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2003.11.011>

Ha, S. T. T., Lim, J. H., & In, B. C. (2019). Simultaneous Inhibition of Ethylene Biosynthesis and Binding Using AVG and 1-MCP in Two Rose Cultivars with Different Sensitivities to Ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation*. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09999-6>

Habben, J. E., Bao, X., Bate, N. J., DeBruin, J. L., Dolan, D., Hasegawa, D., ... Schussler, J. R. (2014). Transgenic alteration of ethylene biosynthesis increases grain yield in maize under field drought-stress conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 12(6), 685–693. <https://doi.org/10.1111/pbi.12172>

Hahn, A., Zimmermann, R., Wanke, D., Harter, K., & Edelmann, H. G. (2008). The root cap determines ethylene-dependent growth and development in maize roots. *Molecular Plant*, 1(2), 359–367. <https://doi.org/10.1093/mp/ssm027>

Hall, A. E., Findell, J. L., Schaller, G. E., Sisler, E. C., & Bleeker, A. B. (2000). *Ethylene Perception by the ERS1 Protein in Arabidopsis 1*. Retrieved from www.plantphysiol.org

Hall, B. P., Shakeel, S. N., & Schaller, G. E. (2007, June). Ethylene receptors: Ethylene perception and signal transduction. *Journal of Plant Growth Regulation*, Vol. 26, pp. 118–130. <https://doi.org/10.1007/s00344-007-9000-0>

- Hamilton, A. J., Lycett, G. W., & Grierson, D. (1990). Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature*, *346*(6281), 284–287. <https://doi.org/10.1038/346284a0>
- Hartman, S., Sasidharan, R., & Voeselek, L. A. C. J. (2020). The role of ethylene in metabolic acclimations to low oxygen. *New Phytologist*, *nph.16378*. <https://doi.org/10.1111/nph.16378>
- Hausinger, R. P. (2004, January). Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 39, pp. 21–68. <https://doi.org/10.1080/10409230490440541>
- He, C., Thomas, A. M., Galimova, G. R., Mebel, A. M., & Kaiser, R. I. (2019). Gas-Phase Formation of 1-Methylcyclopropene and 3-Methylcyclopropene via the Reaction of the Methylidyne Radical (CH; X2II) with Propylene (CH₃CHCH₂; X1A'). *Journal of Physical Chemistry A*. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.9b09815>
- Hegg, E. L., & Jr, L. Q. (1997). The 2-His-1-Carboxylate Facial Triad - An Emerging Structural Motif in Mononuclear Non-Heme Iron(II) Enzymes. *European Journal of Biochemistry*, *250*(3), 625–629. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00625.x>
- Hou, J. Y., Lin, W. L., Lee, N., & Alex Chang, Y. C. (2012). The residual effect of 1-methylcyclopropene on protecting phalaenopsis flowers against ethylene injury. *HortScience*, *47*(10), 1484–1489. <https://doi.org/10.21273/hortsci.47.10.1484>
- Houben, M., & Van de Poel, B. (2019, May 31). 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (ACO): The enzyme that makes the plant hormone ethylene. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00695>
- Hu, Z., Huang, X., Amombo, E., Liu, A., Fan, J., Bi, A., ... Fu, J. (2020). The ethylene responsive factor CdERF1 from bermudagrass (*Cynodon dactylon*) positively regulates cold tolerance. *Plant Science*, *294*, 110432. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110432>
- Hua, J., & Meyerowitz, E. M. (1998). Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, *94*(2), 261–271. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81425-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81425-7)
- Huang, P. Y., Catinot, J., & Zimmerli, L. (2016). Ethylene response factors in *Arabidopsis* immunity. *Journal of Experimental Botany*, *67*(5), 1231–1241. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv518>
- Huang, Y., Li, H., Hutchison, C. E., Laskey, J., & Kieber, J. J. (2003). Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *33*(2), 221–233. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01620.x>
- Hyun, S. C., & Kieber, J. J. (2005, June). Eto Brute? Role of ACS turnover in regulating ethylene biosynthesis. *Trends in Plant Science*, Vol. 10, pp. 291–296. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.04.006>
- Inaba, A., Liu, X., Yokotani, N., Yamane, M., Lu, W. J., Nakano, R., & Kubo, Y. (2007). Differential feedback regulation of ethylene biosynthesis in pulp and peel tissues of banana

- fruit. *Journal of Experimental Botany*, 58(5), 1047–1057. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl265>
- Iwai, T., Miyasaka, A., Seo, S., & Ohashi, Y. (2006). Contribution of ethylene biosynthesis for resistance to blast fungus infection in young rice plants. *Plant Physiology*, 142(3), 1202–1215. <https://doi.org/10.1104/pp.106.085258>
- Jacq, C., Miller, J. R., & Brownlee, G. G. (1977). A pseudogene structure in 5S DNA of *Xenopus laevis*. *Cell*, 12(1), 109–120. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90189-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90189-1)
- Jeong, J., Huber, D. J., & Sargent, S. A. (2002). Influence of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on ripening and cell-wall matrix polysaccharides of avocado (*Persea americana*) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 25(3), 241–256. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(01\)00184-3](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00184-3)
- John, P. (1997). Ethylene biosynthesis: The role of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase, and its possible evolutionary origin. *Physiologia Plantarum*, 100(3), 583–592. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb03064.x>
- John, P., Jr., A., Miller, P., & Miller, A. J. (1985). Activity of the Ethylene-forming Enzyme Measured in vivo at Different Cell potentials. *Journal of Plant Physiology*, 121(5), 397–406. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(85\)80076-6](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(85)80076-6)
- Joo, S., Liu, Y., Lueth, A., & Zhang, S. (2008). MAPK phosphorylation-induced stabilization of ACS6 protein is mediated by the non-catalytic C-terminal domain, which also contains the cis-determinant for rapid degradation by the 26S proteasome pathway. *The Plant Journal*, 54(1), 129–140. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03404.x>
- Joshi, R., Wani, S. H., Singh, B., Bohra, A., Dar, Z. A., Lone, A. A., ... Singla-Pareek, S. L. (2016). Transcription factors and plants response to drought stress: Current understanding and future directions. *Frontiers in Plant Science*, 7(2016JULY). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01029>
- Ju, C., Yoon, G. M., Shemansky, J. M., Lin, D. Y., Ying, Z. I., Chang, J., ... Chang, C. (2012). CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(47), 19486–19491. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214848109>
- Kaul, S., Koo, H. L., Jenkins, J., Rizzo, M., Rooney, T., Tallon, L. J., ... Somerville, C. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(6814), 796–815. <https://doi.org/10.1038/35048692>
- Kawai, Y., Ono, E., & Mizutani, M. (2014). Evolution and diversity of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in plants. *The Plant Journal*, 78(2), 328–343. <https://doi.org/10.1111/tpj.12479>
- Kebenei, Z., Sisler, E. C., Winkelmann, T., & Serek, M. (2003). Efficacy of new inhibitors of ethylene perception in improvement of display life of kalanchoë (*Kalanchoë blossfeldiana* Poelln.) flowers. *Postharvest Biology and Technology*, 30(2), 169–176. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(03\)00107-8](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(03)00107-8)
- Kevany, B. M., Tieman, D. M., Taylor, M. G., Cin, V. D., & Klee, H. J. (2007). Ethylene

receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. *The Plant Journal*, *51*(3), 458–467. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03170.x>

Kieber, J. J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K. A., & Ecker, J. R. (1993). CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in arabidopsis, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell*, *72*(3), 427–441. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90119-B](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90119-B)

Klee, H., & Tieman, D. (2002). The tomato ethylene receptor gene family: Form and function. *Physiologia Plantarum*, Vol. 115, pp. 336–341. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1150302.x>

Koch, G., Rolland, G., Dauzat, M., Bédiée, A., Baldazzi, V., Bertin, N., ... Granier, C. (2019). Leaf production and expansion: A generalized response to drought stresses from cells to whole leaf biomass—a case study in the tomato compound leaf. *Plants*, *8*(10). <https://doi.org/10.3390/plants8100409>

Kohli, A., Sreenivasulu, N., Lakshmanan, P., & Kumar, P. P. (2013). The phytohormone crosstalk paradigm takes center stage in understanding how plants respond to abiotic stresses. *Plant Cell Reports*, *32*(7), 945–957. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1461-y>

Kuroha, T., Nagai, K., Gamuyao, R., Wang, D. R., Furuta, T., Nakamori, M., ... Ashikari, M. (2018). Ethylene-gibberellin signaling underlies adaptation of rice to periodic flooding. *Science*, *361*(6398), 181–186. <https://doi.org/10.1126/science.aat1577>

L-C Wang, K., Li, H., & Ecker, J. R. (2002). *Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks*. <https://doi.org/10.1105/tpc.001768>

Lacey, R. F., & Binder, B. M. (2014a). How plants sense ethylene gas - The ethylene receptors. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *133*, 58–62. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.01.006>

Lacey, R. F., & Binder, B. M. (2014b). How plants sense ethylene gas - The ethylene receptors. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *133*, 58–62. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.01.006>

Larrainzar, E., Molenaar, J. A., Wienkoop, S., Gil-Quintana, E., Alibert, B., Limami, A. M., ... González, E. M. (2014). Drought stress provokes the down-regulation of methionine and ethylene biosynthesis pathways in *Medicago truncatula* roots and nodules. *Plant, Cell and Environment*, *37*(9), 2051–2063. <https://doi.org/10.1111/pce.12285>

Lasserre, E., Bouquin, T., Hernandez, J. A., Pech, J.-C., Balagué, C., & Bull, J. (1996). Structure and expression of three genes encoding ACC oxidase homologs from melon (*Cucumis melo* L.). *MGG Molecular & General Genetics*, *251*(1), 81–90. <https://doi.org/10.1007/bf02174348>

Lee, H. Y., Chen, Y.-C., Kieber, J. J., & Yoon, G. M. (2017). Regulation of the turnover of ACC synthases by phytohormones and heterodimerization in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *91*(3), 491–504. <https://doi.org/10.1111/tpj.13585>

Lee, H. Y., & Yoon, G. M. (2018). Regulation of ethylene biosynthesis by phytohormones in etiolated rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Molecules and Cells*, *41*(4), 311–319.

<https://doi.org/10.14348/molcells.2018.2224>

Leite, E. J., Marcelo, M., Paes De Camargo José, B., Macedo, R., Roberto, P., Thomaziello, A., ... Ferreira, A. (2004). *Fenologia do Cafeeiro: Condições Agrometeorológicas e Balanço Hídrico do Ano Agrícola Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Café Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*. Retrieved from www.embrapa.br/cafe

Lestari, R., Rio, M., Martin, F., Leclercq, J., Woraathasin, N., Roques, S., ... Montoro, P. (2018). Overexpression of *Hevea brasiliensis* ethylene response factor *HbERF-IXc5* enhances growth and tolerance to abiotic stress and affects laticifer differentiation. *Plant Biotechnology Journal*, *16*(1), 322–336. <https://doi.org/10.1111/pbi.12774>

Li, Y., Zhu, B., Xu, W., Zhu, H., Chen, A., Xie, Y., ... Luo, Y. (2007). LeERF1 positively modulated ethylene triple response on etiolated seedling, plant development and fruit ripening and softening in tomato. *Plant Cell Reports*, *26*(11), 1999–2008. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0394-8>

Liang, X., Abel, S., Keller, J. A., Shen, N. F., & Theologian, A. (1992). *The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of Arabidopsis thaliana (ethylene biosynthesis/gene regulation/auxin/cycloheximide/gene evolution)* (Vol. 89).

Lieberman, M., Kunishi, A., Mapson, L., & Wardale, D. (1965). Ethylene production from methionine. *Biochemical Journal*, *97*(2), 449–459. <https://doi.org/10.1042/bj0970449>

Lieberman, Morris, Kunishi, A., Mapson, L. W., & Wardale, D. A. (1966). Stimulation of Ethylene Production in Apple Tissue Slices by Methionine. *Plant Physiology*, *41*(3), 376–382. <https://doi.org/10.1104/pp.41.3.376>

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

Lima, A., Sággio, S., Chalfun-Júnior, A., & Paiva, L. (2011). In silico characterization of putative members of the coffee (*Coffea arabica*) ethylene signaling pathway. *Genetics and Molecular Research*, *10*(2), 1277–1289. <https://doi.org/10.4238/vol10-2gmr1314>

Lin, Z., Zhong, S., & Grierson, D. (2009). Recent advances in ethylene research. *Journal of Experimental Botany*, *60*(12), 3311–3336. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp204>

Linkies, A., Müller, K., Morris, K., Turečková, V., Wenk, M., Cadman, C. S. C., ... Leubner-Metzger, G. (2009). Ethylene interacts with abscisic acid to regulate endosperm rupture during germination: A comparative approach using *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, *21*(12), 3803–3822. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.070201>

Liu, D., Liu, X., Meng, Y., Sun, C., Tang, H., Jiang, Y., ... Gao, J. (2013). An organ-specific role for ethylene in rose petal expansion during dehydration and rehydration. *Journal of Experimental Botany*, *64*(8), 2333–2344. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert092>

Liu, M., Diretto, G., Pirrello, J., Roustan, J. P., Li, Z., Giuliano, G., ... Bouzayen, M. (2014). The chimeric repressor version of an Ethylene Response Factor (ERF) family member, SI-ERF.B3, shows contrasting effects on tomato fruit ripening. *New Phytologist*, *203*(1), 206–218. <https://doi.org/10.1111/nph.12771>

- Liu, M., Pirrello, J., Chervin, C., Roustan, J.-P., & Bouzayen, M. (2015). *Update on Ethylene Control of Fruit Ripening Ethylene Control of Fruit Ripening: Revisiting the Complex Network of Transcriptional Regulation 1*. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01361>
- Liu, Y., & Zhang, S. (2004). Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in arabidopsis. *Plant Cell*, *16*(12), 3386–3399. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.026609>
- Love, J., Bjorklund, S., Vahala, J., Hertzberg, M., Kangasjarvi, J., & Sundberg, B. (2009). Ethylene is an endogenous stimulator of cell division in the cambial meristem of *Populus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(14), 5984–5989. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811660106>
- Ma, B., Cui, M. L., Sun, H. J., Takada, K., Mori, H., Kamada, H., & Ezura, H. (2006). Subcellular localization and membrane topology of the melon ethylene receptor CmERS1. *Plant Physiology*, *141*(2), 587–597. <https://doi.org/10.1104/pp.106.080523>
- Ma, N., Xue, J., Li, Y., Liu, X., Dai, F., Jia, W., ... Gao, J. (2008). Rh-PIP2;1, a rose aquaporin gene, is involved in ethylene-regulated petal expansion. *Plant Physiology*, *148*(2), 894–907. <https://doi.org/10.1104/pp.108.120154>
- Martin, M. N., & Saftner, R. A. (1995). Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid N-malnoyltransferase from tomato fruit. *Plant Physiology*, *108*(3), 1241–1249. <https://doi.org/10.1104/pp.108.3.1241>
- Martinez, S., & Hausinger, R. P. (2015, August 21). Catalytic mechanisms of Fe(II)- and 2-Oxoglutarate-dependent oxygenases. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 290, pp. 20702–20711. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.648691>
- Massolo, J. F., González Forte, L., Concellón, A., Viña, S. Z., & Vicente, A. R. (2019). Effects of ethylene and 1-MCP on quality maintenance of fresh cut celery. *Postharvest Biology and Technology*, *148*, 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.11.007>
- Meng, Y., Ma, N., Zhang, Q., You, Q., Li, N., Ali Khan, M., ... Gao, J. (2014). Precise spatio-temporal modulation of ACC synthase by MPK6 cascade mediates the response of rose flowers to rehydration. *The Plant Journal*, *79*(6), 941–950. <https://doi.org/10.1111/tpj.12594>
- Mirica, L. M., & Klinman, J. P. (2008). The nature of O₂ activation by the ethylene-forming enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(6), 1814–1819. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711626105>
- Miyazaki, J. H., & Yang, S. F. (1987). The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis. *Physiologia Plantarum*, *69*(2), 366–370. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1987.tb04302.x>
- Mizukami, Y. (2001, December 1). A matter of size: Developmental control of organ size in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol. 4, pp. 533–539. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00212-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00212-0)
- Morais, H., Caramori, P. H., Koguish, M. S., & De Arruda Ribeiro, A. M. (2008). Escala

fenológica detalhada da fase reprodutiva de coffeea arabica. *Bragantia*, 67(1), 257–260. <https://doi.org/10.1590/s0006-87052008000100031>

Morris, D. A., & Larcombe, N. J. (1995). Phloem Transport and Conjugation of Foliar-Applied 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Journal of Plant Physiology*, 146(4), 429–436. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)82004-3](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)82004-3)

Moussatche, P., & Klee, H. J. (2004). *Autophosphorylation Activity of the Arabidopsis Ethylene Receptor Multigene Family**. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403100200>

Müller-Dieckmann, H. J., Grantz, A. A., & Kim, S. H. (1999). The structure of the signal receiver domain of the Arabidopsis thaliana ethylene receptor ETR1. *Structure*, 7(12), 1547–1556. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)88345-8](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)88345-8)

Mullins, E. D., McCollum, T. G., & McDonald, R. E. (2000). Consequences on ethylene metabolism of inactivating the ethylene receptor sites in diseased non-climacteric fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 19(2), 155–164. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00077-6](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00077-6)

Muñozmuñoz-Robredo, P., Rubio, P., Infante, R., Campos-Vargas, R., Manríquez, D., González-Agüero, M., & Defilippi, B. G. (2011). Ethylene biosynthesis in apricot: Identification of a ripening-related 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase (ACS) gene. *Postharvest Biology and Technology*, 63, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.09.001>

Murphy, L. J., Robertson, K. N., Harroun, S. G., Brosseau, C. L., Werner-Zwanziger, U., Moilanen, J., ... Clyburne, J. A. C. (2014). A simple complex on the verge of breakdown: Isolation of the elusive cyanofolate ion. *Science*, 344(6179), 75–78. <https://doi.org/10.1126/science.1250808>

Nakatsuka, A., Murachi, S., Okunishi, H., Shiomi, S., Nakano, R., Kubo, Y., & Inaba, A. (1998). Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiology*, 118(4), 1295–1305. <https://doi.org/10.1104/pp.118.4.1295>

Negi, S., Ivanchenko, M. G., & Muday, G. K. (2008). Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, 55(2), 175–187. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2008.03495.x>

Nie, X., Singh, R. P., & Tai, G. C. C. (2002). Molecular characterization and expression analysis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homologs from potato under abiotic and biotic stresses. *Genome*, 45(5), 905–913. <https://doi.org/10.1139/g02-062>

O'Donnell, P. J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H. M. O., & Bowles, D. J. (1996). Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science*, 274(5294), 1914–1917. <https://doi.org/10.1126/science.274.5294.1914>

O'Malley, R. C., Rodriguez, F. I., Esch, J. J., Binder, B. M., O'Donnell, P., Klee, H. J., & Bleecker, A. B. (2005). Ethylene-binding activity, gene expression levels, and receptor system output for ethylene receptor family members from Arabidopsis and tomato†. *The Plant*

Journal, 41(5), 651–659. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02331.x>

Ohme-Takagi, M., & Shinshi, H. (1995). Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell*, 7(2), 173–182. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.2.173>

Özkaya, O., Yildirim, D., DüNDAR, Ö., & Tükel, S. S. (2016). Effects of 1-methylcyclopropene (1-MCP) and modified atmosphere packaging on postharvest storage quality of nectarine fruit. *Scientia Horticulturae*, 198, 454–461. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.12.016>

Paes, Â., Camargo, D. E., Bento, M., & De Camargo, P. (n.d.). *AGROMETEOROLOGIA DEFINIÇÃO E ESQUEMATIZAÇÃO DAS FASES FENOLÓGICAS DO CAFEIEIRO ARÁBICA NAS CONDIÇÕES TROPICAIS DO BRASIL (1)*.

Pak Dek, M. S., Padmanabhan, P., Subramanian, J., & Paliyath, G. (2018). Inhibition of tomato fruit ripening by 1-MCP, wortmannin and hexanal is associated with a decrease in transcript levels of phospholipase D and other ripening related genes. *Postharvest Biology and Technology*, 140, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.02.009>

Park, C. H., Roh, J., Youn, J. H., Son, S. H., Park, J. H., Kim, S. Y., ... Kim, S. K. (2018). Arabidopsis ACC oxidase 1 coordinated by multiple signals mediates ethylene biosynthesis and is involved in root development. *Molecules and Cells*, 41(10), 923–932. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.0092>

Parkinson, C. L., Adams, K. L., & Palmer, J. D. (1999). Multigene analyses identify the three earliest lineages of extant flowering plants. *Current Biology*, 9(24), 1485–1491. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)80119-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)80119-0)

Parreiras Pereira, S., Ferreira Bartholo, G., Pereira Baliza, D., Moreira Sobreira, F., & José Guimarães, R. (n.d.). Crescimento, produtividade e bionalidade do cafeeiro em função do espaçamento de cultivo. In *Pesq. agropec. bras* (Vol. 46).

Paudel, J. R., & Bede, J. C. (2015). Ethylene Signaling Modulates Herbivore-Induced Defense Responses in the Model Legume *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(5), 569–579. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-14-0348-R>

Pei, H., Ma, N., Tian, J., Luo, J., Chen, J., Li, J., ... Gao, J. (2013). An NAC transcription factor controls ethylene-regulated cell expansion in flower petals. *Plant Physiology*, 163(2), 775–791. <https://doi.org/10.1104/pp.113.223388>

Peiser, G. D., Wang, T., Hoffman, N. E., Yang, S. F., Liut, H., WALSHt, C. T., & Stumpf, P. K. (1984). Formation of cyanide from carbon 1 of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid during its conversion to ethylene (f-cyanoalanine/cyanoformic acid/ethylene metabolism) Communicated by. In *Biochemistry* (Vol. 81).

Pelaz, S., Ditta, G. S., Baumann, E., Wisman, E., & Yanofsky, M. F. (2000). B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature*, 405(6783), 200–203. <https://doi.org/10.1038/35012103>

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 45e – 45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>

- Picini, A. G., De Camargo, M. B. P., Ortolani, A. A., Fazuoli, L. C., & Gallo, P. B. (1999). Desenvolvimento e teste de modelos agrometeorológicos para a estimativa de produtividade do cafeeiro. *Bragantia*, *58*(1), 157–170. <https://doi.org/10.1590/s0006-87051999000100015>
- Pierik, R., Sasidharan, R., & Voeselek, L. A. C. J. (2007, June 10). Growth control by ethylene: Adjusting phenotypes to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation*, Vol. 26, pp. 188–200. <https://doi.org/10.1007/s00344-006-0124-4>
- Pierik, R., Tholen, D., Poorter, H., Visser, E. J. W., & Voeselek, L. A. C. J. (2006). The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends in Plant Science*, *11*(4), 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.02.006>
- Pimenta, C. J., & Vilela, E. R. (2003). Efeito do tipo e época de colheita na qualidade do café (*Coffea arabica* L.). *Acta Scientiarum. Agronomy*, *25*(1), 131–136. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v25i1.2464>
- Pirrello, J., Prasad, B. C. N., Zhang, W., Chen, K., Mila, I., Zouine, M., ... Bouzayen, M. (2012). Functional analysis and binding affinity of tomato ethylene response factors provide insight on the molecular bases of plant differential responses to ethylene. *BMC Plant Biology*, *12*, 190. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-190>
- Potuschak, T., Lechner, E., Parmentier, Y., Yanagisawa, S., Grava, S., Koncz, C., & Genschik, P. (2003). EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two Arabidopsis F box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell*, *115*(6), 679–689. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00968-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00968-1)
- Protasio Pereira, L. F., Galvão, R. M., Kobayashi, A. K., Cação, S. M. B., & Esteves Vieira, L. G. (2005). Ethylene production and acc oxidase gene expression during fruit ripening of *Coffea arabica* L. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *17*(3), 283–289. <https://doi.org/10.1590/s1677-04202005000300002>
- Qiao, H., Shen, Z., Huang, S. S. C., Schmitz, R. J., Urich, M. A., Briggs, S. P., & Ecker, J. R. (2012). Processing and subcellular trafficking of ER-tethered EIN2 control response to ethylene gas. *Science*, *338*(6105), 390–393. <https://doi.org/10.1126/science.1225974>
- Qu, X., & Schaller, G. E. (2004). Requirement of the histidine kinase domain for signal transduction by the ethylene receptor ETR1. *Plant Physiology*, *136*(2), 2961–2970. <https://doi.org/10.1104/pp.104.047126>
- Rena, A. B. (n.d.). *Floração Do Cafeeiro : Um Enigma*.
- Rickes, L. N., Klumb, E. K., Benitez, L. C., Braga, E. J. B., & Bianchi, V. J. (2019). Differential expression of the genes involved in responses to water-deficit stress in peach trees cv. Chimarrita grafted onto two different rootstocks. *Bragantia*, *78*(1), 60–70. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.2017372>
- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C. Z., Keddie, J., ... Yu, G. L. (2000). Arabidopsis transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, *290*(5499), 2105–2110. <https://doi.org/10.1126/science.290.5499.2105>
- Riov, J., Dagan, E., Goren, R., & Yang, S. F. (1990). Characterization of abscisic acid-induced ethylene production in citrus leaf and tomato fruit tissues. *Plant Physiology*, *92*(1),

48–53. <https://doi.org/10.1104/pp.92.1.48>

Robles, L., Stepanova, A., & Alonso, J. (2013). Molecular Mechanisms of Ethylene-Auxin Interaction. *Molecular Plant*, 6, 1734–1737. <https://doi.org/10.1093/mp/sst113>

Rocha, O. C., Guerra, A. F., Rodrigues, G. C., Sanzonowicz, C., Silva, F. A. M. d., Ribeiro, L. F., & Toledo, P. M. dos R. (2007). *Manejo estratégico de irrigação para a cultura do café* (*Coffea arabica* L.) no cerrado brasileiro. <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/10820/1687>. Retrieved from http://hdl.handle.net/10820/1687%5Cnhttp://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/10820/1687/179995_Art112f.pdf?sequence=1

Rocklin, A. M., Kato, K., Liu, H. W., Que, L., & Lipscomb, J. D. (2004). Mechanistic studies of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase: Single turnover reaction. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 9(2), 171–182. <https://doi.org/10.1007/s00775-003-0510-3>

RODRIGUES, J. P. B. (2015). *Efeito Do MathuryTM E Ethephon Na Maturação Dos Frutos E Qualidade Da Bebida De Café*. Retrieved from <http://uenf.br/posgraduacao/producao-vegetal/wp-content/uploads/sites/10/2015/08/Dissertação-João-Paulo-Braga-Rodrigues.pdf>

Rottmann, W. H., Peter, G. F., Oeller, P. W., Keller, J. A., Shen, N. F., Nagy, B. P., ... Theologis, A. (1991). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by a multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence. *Journal of Molecular Biology*, 222(4), 937–961. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90587-V](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90587-V)

Ruduś, I., Sasiak, M., & Kepczyński, J. (2013). Regulation of ethylene biosynthesis at the level of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO) gene. *Acta Physiologiae Plantarum*, Vol. 35, pp. 295–307. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1096-6>

Sá, C. R. L., Silva, E. O., Terao, D., & Saraiva, A. C. M. (2008). Métodos de Controle do Etileno na Qualidade e Conservação Pós-Colheita de Frutas. *Embrapa Agroindústria Tropical*, 36.

Ságio, S. A., Barreto, H. G., Lima, A. A., Moreira, R. O., Rezende, P. M., Paiva, L. V., & Chalfun-Junior, A. (2014). Identification and expression analysis of ethylene biosynthesis and signaling genes provides insights into the early and late coffee cultivars ripening pathway. *Planta*, 239(5), 951–963. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2026-1>

Sakai, H., Hua, J., Chen, Q. G., Chang, C., Medrano, L. J., Bleecker, A. B., & Meyerowitz, E. M. (1998). ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in Arabidopsis. In *Plant Biology* (Vol. 95). Retrieved from www.pnas.org.

Saleh-Lakha, S., Grichko, V. P., Sisler, E. C., & Glick, B. R. (2004). The effect of the ethylene action inhibitor 1-cyclopropenylmethyl butyl ether on early plant growth. *Journal of Plant Growth Regulation*, 23(4), 307–312. <https://doi.org/10.1007/s00344-004-0011-9>

Sangtarash, M. H., Qaderi, M. M., Chinnappa, C. C., & Reid, D. M. (2009). Differential sensitivity of canola (*Brassica napus*) seedlings to ultraviolet-B radiation, water stress and abscisic acid. *Environmental and Experimental Botany*, 66(2), 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.03.004>

Santos, I. S. (2016). Influência do etileno na regulação do florescimento de *Coffea arabica*

L.". *Dissertação: Universidade Federal De Lavras.*

Sasidharan, R., & Voeselek, L. A. C. J. (1991). *Ethylene-Mediated Acclimations to Flooding Stress I*. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00387>

Savada, R. P., Ozga, J. A., Jayasinghege, C. P. A., Waduthanthri, K. D., & Reinecke, D. M. (2017). Heat stress differentially modifies ethylene biosynthesis and signaling in pea floral and fruit tissues. *Plant Molecular Biology*, *95*(3), 313–331. <https://doi.org/10.1007/s11103-017-0653-1>

Schachtman, D. P., & Goodger, J. Q. D. (2008, June 1). Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends in Plant Science*, Vol. 13, pp. 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.04.003>

Schiefelbein, J. W. (2000). Constructing a plant cell. The genetic control of root hair development. *Plant Physiology*, *124*(4), 1525–1531. <https://doi.org/10.1104/pp.124.4.1525>

Schroeder, J. I., Allen, G. J., Hugouvieux, V., Kwak, J. M., & Waner, D. (2001). GUARD CELL SIGNAL TRANSDUCTION. In *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* (Vol. 52). Retrieved from www.annualreviews.org

Sebastià, C. H., Hardin, S. C., Clouse, S. D., Kieber, J. J., & Huber, S. C. (2004). Identification of a new motif for CDPK phosphorylation in vitro that suggests ACC synthase may be a CDPK substrate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *428*(1), 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.04.025>

Seki, M., Umezawa, T., Urano, K., & Shinozaki, K. (2007, June). Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol. 10, pp. 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.014>

Sell, S., & Hehl, R. (2005). A fifth member of the tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) oxidase gene family harbours a leucine zipper and is anaerobically induced. *DNA Sequence - Journal of DNA Sequencing and Mapping*, *16*(1), 80–82. <https://doi.org/10.1080/10425170500050817>

Seo, Y. S., Yoo, A., Jung, J., Sung, S. K., Yang, D. R., Kim, W. T., & Lee, W. (2004). The active site and substrate-binding mode of 1-aminocyclopropane-1- carboxylate oxidase determined by site-directed mutagenesis and comparative modelling studies. *Biochemical Journal*, *380*(2), 339–346. <https://doi.org/10.1042/BJ20031762>

Serek, E. C. S. M. (1999). Compounds controlling the ethylene receptor. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*.

Serek, M., & Sisler, E. C. (2001). Efficacy of inhibitors of ethylene binding in improvement of the postharvest characteristics of potted flowering plants. *Postharvest Biology and Technology*, *23*(2), 161–166. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(01\)00109-0](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00109-0)

Seymour, G. B., Chapman, N. H., Chew, B. L., & Rose, J. K. C. (2013, April). Regulation of ripening and opportunities for control in tomato and other fruits. *Plant Biotechnology Journal*, Vol. 11, pp. 269–278. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00738.x>

Shakeel, S. N., Wang, X., Binder, B. M., & Schaller, G. E. (2013). Mechanisms of signal

transduction by ethylene: Overlapping and non-overlapping signalling roles in a receptor family. *AoB PLANTS*, Vol. 5. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plt010>

Sharp, R. E. (2002). Interaction with ethylene: Changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25(2), 211–222. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2002.00798.x>

Sharp, R. E., Wu, Y., Voetberg, G. S., Saab, I. N., & LeNoble, M. E. (1994). Confirmation that abscisic acid accumulation is required for maize primary root elongation at low water potentials. *Journal of Experimental Botany*, 45(Special_Issue), 1743–1751. https://doi.org/10.1093/jxb/45.special_issue.1743

Shaw, J. F., Chou, Y. S., Chang, R. C., & Yang, S. F. (1996). Characterization of the ferrous ion binding sites of apple 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by site-directed mutagenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 225(3), 697–700. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1237>

Shi, L. S., & Liu, J. P. (2016). Molecular cloning and expression analysis of an 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene from *Oncidium Gower Ramsey*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 469(2), 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.11.107>

Shi, Y. H., Zhu, S. W., Mao, X. Z., Feng, J. X., Qin, Y. M., Zhang, L., ... Zhu, Y. X. (2006). Transcriptome profiling, molecular biological, and physiological studies reveal a major role for ethylene in cotton fiber cell elongation. *Plant Cell*, 18(3), 651–664. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.040303>

Shinohara, T., Martin, E. A., & Leskovar, D. I. (2017). Ethylene regulators influence germination and root growth of globe artichoke seedlings exposed to heat stress conditions. *Seed Science and Technology*, 45(1), 167–178. <https://doi.org/10.15258/sst.2017.45.1.07>

Siqueira, H. H. de, & Abreu, C. M. P. de. (2006). Composição físico-química e qualidade do café submetido a dois tipos de torração e com diferentes formas de processamento. *Ciência e Agrotecnologia*, 30(1), 112–117. <https://doi.org/10.1590/s1413-70542006000100016>

Sisler, E. C., & Serek, M. (1997a). Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. *Physiologia Plantarum*, 100(3), 577–582. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb03063.x>

Sisler, E. C., & Serek, M. (1997b). Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. *Physiologia Plantarum*, 100(3), 577–582. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1997.1000320.x>

Sisler, Edward C. (2006, July). The discovery and development of compounds counteracting ethylene at the receptor level. *Biotechnology Advances*, Vol. 24, pp. 357–367. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.01.002>

Sisler, Edward C., Alwan, T., Goren, R., Serek, M., & Apelbaum, A. (2003). 1-Substituted cyclopropenes: Effective blocking agents for ethylene action in plants. *Plant Growth Regulation*, 40(3), 223–228. <https://doi.org/10.1023/A:1025080420990>

Sisler, Edward C., Serek, M., Dupille, E., & Goren, R. (1999). Inhibition of ethylene

responses by 1-Methylcyclopropene and 3-Methylcyclopropene. *Plant Growth Regulation*, 27(2), 105–111. <https://doi.org/10.1023/A:1006153016409>

Sisler, Edward C, Serek, M., Dupille, E., & Goren, R. (1999). Inhibition of ethylene responses by 1-Methylcyclopropene and 3-Methylcyclopropene. In *Plant Growth Regulation* (Vol. 27).

Soares, A. R., Mantovani, E. C., Rena, A. B., & Soares, A. A. (2005). Irrigação e fisiologia da floração em cafeeiros adultos na região da zona da mata de Minas Gerais. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 27(1), 117–125. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v27i1.2128>

Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q., & Ecker, J. R. (1998). Nuclear events in ethylene signaling: A transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes and Development*, 12(23), 3703–3714. <https://doi.org/10.1101/gad.12.23.3703>

Spollen, W. G., Lenoble, M. E., Samuels, T. D., Bernstein, N., & Sharp, R. E. (2000). Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant Physiology*, 122(3), 967–976. <https://doi.org/10.1104/pp.122.3.967>

Staswick, P. E., & Tiryaki, I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugate it to isoleucine in Arabidopsis W inside box sign. *Plant Cell*, 16(8), 2117–2127. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.023549>

Steibel, J. P., Poletto, R., Coussens, P. M., & Rosa, G. J. M. (2009). A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. *Genomics*, 94(2), 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2009.04.008>

Stepanova, A. N., & Alonso, J. M. (2005). Ethylene signalling and response pathway: a unique signalling cascade with a multitude of inputs and outputs. *Physiologia Plantarum*, 123(2), 195–206. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00447.x>

Subbiah, V., & Reddy, K. J. (2010). Interactions between ethylene, abscisic acid and cytokinin during germination and seedling establishment in Arabidopsis. *Journal of Biosciences*, 35(3), 451–458. <https://doi.org/10.1007/s12038-010-0050-2>

Sun, Xiangzhong, Li, Y., He, W., Ji, C., Xia, P., Wang, Y., ... Guo, H. (2017). Pyrazinamide and derivatives block ethylene biosynthesis by inhibiting ACC oxidase. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms15758>

Sun, Xiaoming, Zhao, T., Gan, S., Ren, X., Fang, L., Karungo, S. K., ... Xin, H. (2016). Ethylene positively regulates cold tolerance in grapevine by modulating the expression of ETHYLENE RESPONSE FACTOR 057. *Scientific Reports*, 6(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep24066>

Sylvia, M., & Pirrung, M. C. (1996). *United States Patent* (19). (19).

Tang, X., Wang, H., Brandt, A. S., & Woodson, W. R. (1993). Organization and structure of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family from *Petunia hybrida*. *Plant Molecular Biology*, 23(6), 1151–1164. <https://doi.org/10.1007/BF00042349>

Tang, X., & Woodson, W. R. (1996). Temporal and spatial expression of 1-

aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase mRNA following pollination of immature and mature petunia flowers. *Plant Physiology*, *112*(2), 503–511.

<https://doi.org/10.1104/pp.112.2.503>

Tatsuki, M., & Mori, H. (2001). Phosphorylation of Tomato 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid Synthase, LE-ACS2, at the C-terminal Region. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(30), 28051–28057. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101543200>

Thongkum, M., Imsabai, W., Burns, P., McAtee, P. A., Schaffer, R. J., Allan, A. C., & Ketsa, S. (2018). The effect of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on expression of ethylene receptor genes in durian pulp during ripening. *Plant Physiology and Biochemistry*, *125*, 232–238. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.02.004>

Tian, M. S., Prakash, S., Elgar, H. J., Young, H., Burmeister, D. M., & Ross, G. S. (2000). Responses of strawberry fruit to 1-methylcyclopropene (1-MCP) and ethylene. *Plant Growth Regulation*, *32*(1), 83–90. <https://doi.org/10.1023/A:1006409719333>

Tieman, D M, Ciardi, J. A., Taylor, M. G., & Klee, H. J. (2001). Members of the tomato LeEIL (EIN3-like) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, *26*(1), 47–58. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01006.x>

Tieman, Denise M, Taylor, M. G., Ciardi, J. A., & Klee, H. J. (n.d.). *The tomato ethylene receptors NR and LeETR4 are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family*. Retrieved from www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.090550597

Toivonen, P. M. A., & Lu, C. (2005). Studies on elevated temperature, short-term storage of “Sunrise” Summer apples using 1-MCP to maintain quality. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *80*(4), 439–446. <https://doi.org/10.1080/14620316.2005.11511957>

Tombesi, S., Frioni, T., Poni, S., & Palliotti, A. (2018). Effect of water stress “memory” on plant behavior during subsequent drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, *150*, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.03.009>

Trevenzoli Favero, B., Poimenopoulou, E., Himmelboe, M., Stergiou, T., Müller, R., & Lütken, H. (2016). Efficiency of 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatment after ethylene exposure of mini-Phalaenopsis. *Scientia Horticulturae*, *211*, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.08.010>

Trivellini, A., Ferrante, A., Vernieri, P., & Serra, G. (2011). Effects of abscisic acid on ethylene biosynthesis and perception in *Hibiscus rosa-sinensis* L. flower development. *Journal of Experimental Botany*, *62*(15), 5437–5452. <https://doi.org/10.1093/jxb/err218>

Tsuchisaka, A., & Theologis, A. (2004a). Unique and overlapping expression patterns among the Arabidopsis 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. *Plant Physiology*, *136*(2), 2982–3000. <https://doi.org/10.1104/pp.104.049999>

Tsuchisaka, A., & Theologis, A. (2004b). Unique and overlapping expression patterns among the Arabidopsis 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. *Plant Physiology*, *136*(2), 2982–3000. <https://doi.org/10.1104/pp.104.049999>

- Tsuchisaka, A., Yu, G., Jin, H., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Zhang, X., ... Theologis, A. (2009). A combinatorial interplay among the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate isoforms regulates ethylene biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, *183*(3), 979–1003. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.107102>
- Tu, Y., He, B., Gao, S., Guo, D., Jia, X., Dong, X., & Guo, M. (2019). CTACO1 overexpression resulted in the alteration of the flavonoids profile of safflower. *Molecules*, *24*(6). <https://doi.org/10.3390/molecules24061128>
- Tucker, M. L., Xue, P., & Yang, R. (2010). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) concentration and ACC synthase expression in soybean roots, root tips, and soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*)-infected roots. *Journal of Experimental Botany*, *61*(2), 463–472. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp317>
- Tudela, D., & Primo-Millo, E. (1992). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid transported from roots to shoots promotes leaf abscission in cleopatra mandarin (*Citrus reshni* Hort, ex tan.) seedlings rehydrated after water stress. *Plant Physiology*, *100*(1), 131–137. <https://doi.org/10.1104/pp.100.1.131>
- Tutar, Y. (2012). Pseudogenes. *Comparative and Functional Genomics*, Vol. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/424526>
- Valadares, S. V., Neves, J. C. L., Rosa, G. N. G. P., Martinez, H. E. P., Venegas, V. H. A., & de Lima, P. C. (2013). Produtividade e bienalidade da produção de cafezais adensados, sob diferentes doses de N e K. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, *48*(3), 296–303. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000300008>
- Van de Poel, B., Vandenzavel, N., Smet, C., Nicolay, T., Bulens, I., Mellidou, I., ... Geeraerd, A. H. (2014). Tissue specific analysis reveals a differential organization and regulation of both ethylene biosynthesis and E8 during climacteric ripening of tomato. *BMC Plant Biology*, *14*(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-11>
- Van Der Straeten, D., Anuntalabhochai, S., Van Caeneghem, W., Zhou, Z., Gielen, J., & Van Montagu, M. (1997). Expression of three members of the ACC synthase gene family in deepwater rice by submergence, wounding and hormonal treatments. *Plant Science*, *124*(1), 79–87. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(97\)04609-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(97)04609-8)
- Van Der Straeten, D., Rodrigues-Pousada, R. A., Villarroel, R., Hanley, S., Goodmant, H. M., & Van Montagu, M. (1992). *Plant Biology Cloning, genetic mapping, and expression analysis of an Arabidopsis thaliana gene that encodes 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (development/ethylene/gene regulation/restriction fragment length polymorphism mapping/stress)* (Vol. 89).
- van Es, S. W., Silveira, S. R., Rocha, D. I., Bimbo, A., Martinelli, A. P., Dornelas, M. C., ... Immink, R. G. H. (2018). Novel functions of the *Arabidopsis* transcription factor TCP5 in petal development and ethylene biosynthesis. *Plant Journal*, *94*(5), 867–879. <https://doi.org/10.1111/tpj.13904>
- Vanderstraeten, L., & van Der Straeten, D. (2017, January 24). Accumulation and transport of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: Current status, considerations for future research and agronomic applications. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00038>

Vanin, E. F. (1985). PROCESSED PSEUDOGENES: CHARACTERISTICS AND EVOLUTION. In *Ann. Rev. Genet* (Vol. 19). Retrieved from www.annualreviews.org

Ververidis, P., & John, P. (1991). Complete recovery in vitro of ethylene-forming enzyme activity. *Phytochemistry*. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)85241-Q](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)85241-Q)

Villegente, M., Marmey, P., Job, C., Galland, M., Cueff, G., Godin, B., ... Job, D. (2017). A Combination of Histological, Physiological, and Proteomic Approaches Shed Light on Seed Desiccation Tolerance of the Basal Angiosperm *Amborella trichopoda*. *Proteomes*, 5(4), 19. <https://doi.org/10.3390/proteomes5030019>

Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R. K., ... Sharma, S. (2017, February 20). Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: A review on current knowledge and future prospects. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00161>

Vukašinović, N., Cvrčková, F., Eliáš, M., Cole, R., Fowler, J. E., Žárský, V., & Synek, L. (2014). Dissecting a hidden gene duplication: The *Arabidopsis thaliana* SEC10 locus. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094077>

Wang, D., Fan, J., & Ranu, R. S. (2004). Cloning and expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase cDNA from *Rosa x hybrida*. *Plant Cell Reports*, 22(6), 422–429. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0721-7>

Wang, J. H., Gu, K. Di, Han, P. L., Yu, J. Q., Wang, C. K., Zhang, Q. Y., ... Hao, Y. J. (2020). Apple ethylene response factor MdERF11 confers resistance to fungal pathogen *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Science*, 291, 110351. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110351>

Wang, K. L. C., Yoshida, H., Lurin, C., & Ecker, J. R. (2004). Regulation of ethylene gas biosynthesis by the *Arabidopsis* ETO1 protein. *Nature*, 428(6986), 945–950. <https://doi.org/10.1038/nature02516>

Wang, P., Moore, B. M., Panchy, N. L., Meng, F., Lehti-Shiu, M. D., & Shiu, S. H. (2018). Factors influencing gene family size variation among related species in a plant family, solanaceae. *Genome Biology and Evolution*, 10(10), 2596–2613. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy193>

Wang, W., Hall, A. E., O'Malley, R., & Bleecker, A. B. (2003). Canonical histidine kinase activity of the transmitter domain of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis* is not required for signal transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(1), 352–357. <https://doi.org/10.1073/pnas.0237085100>

Wani, S. H., Kumar, V., Shriram, V., & Sah, S. K. (2016, June 1). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *Crop Journal*, Vol. 4, pp. 162–176. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2016.01.010>

Watkins, C B. (2008). *POSTHARVEST RIPENING REGULATION AND INNOVATION IN STORAGE TECHNOLOGY* | *International Society for Horticultural Science*. 2, 51–58. Retrieved from http://www.ishs.org/ishs-article/796_4

Watkins, Chris B. (2006, July). The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and

vegetables. *Biotechnology Advances*, Vol. 24, pp. 389–409.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.01.005>

Wen, X., Zhang, C., Ji, Y., Zhao, Q., He, W., An, F., ... Guo, H. (2012, November). Activation of ethylene signaling is mediated by nuclear translocation of the cleaved EIN2 carboxyl terminus. *Cell Research*, Vol. 22, pp. 1613–1616.
<https://doi.org/10.1038/cr.2012.145>

Wen, Y.-Z., Zheng, L.-L., Qu, L.-H., Ayala, F. J., & Lun, Z.-R. (2012). Pseudogenes are not pseudo any more. *RNA Biology*, 9(1), 27–32. <https://doi.org/10.4161/rna.9.1.18277>

Wilkinson, J. Q., Lanahan, M. B., Clark, D. G., Bleeker, A. B., Chang, C., Meyerowitz, E. M., & Klee, H. J. (1997). A Dominant Mutant Receptor From Arabidopsis Confers Ethylene Insensitivity In Heterologous Plants. *Nature Biotechnology*, 15(5), 444–447.
<https://doi.org/10.1038/nbt0597-444>

Wilkinson, S., Kudoyarova, G. R., Veselov, D. S., Arkhipova, T. N., & Davies, W. J. (2012). Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management. *Journal of Experimental Botany*, 63(9), 3499–3509. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers148>

Win, N. M., Yoo, J., Kwon, S.-I., Watkins, C. B., & Kang, I.-K. (2019). Characterization of Fruit Quality Attributes and Cell Wall Metabolism in 1-Methylcyclopropene (1-MCP)-Treated ‘Summer King’ and ‘Green Ball’ Apples During Cold Storage. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01513>

Wolters, H., & Jürgens, G. (2009, May). Survival of the flexible: Hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 10, pp. 305–317.
<https://doi.org/10.1038/nrg2558>

Wu, Y.-S., & Yang, C.-Y. (2019). Ethylene-mediated signaling confers thermotolerance and regulates transcript levels of heat shock factors in rice seedlings under heat stress. *Botanical Studies*, 60(1). <https://doi.org/10.1186/s40529-019-0272-z>

Xie, J., Li, Y., Liu, X., Zhao, Y., Li, B., Ingvarsson, P. K., & Zhanga, D. (2019). Evolutionary origins of pseudogenes and their association with regulatory sequences in plants. *Plant Cell*, 31(3), 563–578. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00601>

Yamagami, T., Tsuchisaka, A., Yamada, K., Haddon, W. F., Harden, L. A., & Theologis, A. (2003). Biochemical diversity among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase isozymes encoded by the Arabidopsis gene family. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(49), 49102–49112. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308297200>

YANG, J. C., ZHANG, J. H., YE, Y. X., WANG, Z. Q., ZHU, Q. S., & LIU, L. J. (2004). Involvement of abscisic acid and ethylene in the responses of rice grains to water stress during filling. *Plant, Cell and Environment*, 27(8), 1055–1064. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01210.x>

Yang, L., Takuno, S., Waters, E. R., & Gaut, B. S. (2011). Lowly Expressed Genes in Arabidopsis thaliana Bear the Signature of Possible Pseudogenization by Promoter Degradation. *Molecular Biology and Evolution*, 28(3), 1193–1203.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msq298>

- Yang, X., Song, J., Campbell-Palmer, L., Fillmore, S., & Zhang, Z. (2013). Effect of ethylene and 1-MCP on expression of genes involved in ethylene biosynthesis and perception during ripening of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *78*, 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.11.012>
- Yokotani, N. (2003). Characterization of a novel tomato EIN3-like gene (LeEIL4). *Journal of Experimental Botany*, *54*(393), 2775–2776. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg308>
- Yoo, A., Seo, Y. S., Jung, J. W., Sung, S. K., Kim, W. T., Lee, W., & Yang, D. R. (2006). Lys296 and Arg299 residues in the C-terminus of MD-ACO1 are essential for a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase enzyme activity. *Journal of Structural Biology*, *156*(3), 407–420. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.08.012>
- Yoon, G. M. (2015). New insights into the protein turnover regulation in ethylene biosynthesis. *Molecules and Cells*, Vol. 38, pp. 597–603. <https://doi.org/10.14348/molcells.2015.0152>
- Yoshida, H., Nagata, M., Saito, K., Wang, K. L., & Ecker, J. R. (2005). *BMC Plant Biology Arabidopsis ETO1 specifically interacts with and negatively regulates type 2 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthases*. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-5-14>
- Young, T. E., Gallie, D. R., & DeMason, D. A. (1997). Ethylene-mediated programmed cell death during maize endosperm development of wild-type and shrunken2 genotypes. *Plant Physiology*, *115*(2), 737–751. <https://doi.org/10.1104/pp.115.2.737>
- Yu, J., Ke, T., Tehrim, S., Sun, F., Liao, B., & Hua, W. (2015). PTGBase: an integrated database to study tandem duplicated genes in plants. *Database*, *2015*. <https://doi.org/10.1093/database/bav017>
- Yu, W., Sheng, J., Zhao, R., Wang, Q., Ma, P., & Shen, L. (2019). Ethylene biosynthesis is involved in regulating chilling tolerance and SICBF1 gene expression in tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *149*, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.11.012>
- Yu, Y. B., Adams, D. O., & Yang, S. F. (1979). 1-Aminocyclopropanecarboxylate synthase, a key enzyme in ethylene biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90420-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90420-X)
- Zarembinski, T. I., & Theologis, A. (1997). Expression characteristics of OS-ACS1 and OS-ACS2, two members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in rice (*Oryza sativa* L. cv. Habiganj Aman II) during partial submergence. *Plant Molecular Biology*, *33*(1), 71–77. <https://doi.org/10.1023/B:PLAN.0000009693.26740.c3>
- Zhang, C., Zhang, L., Zhang, S., Zhu, S., Wu, P., Chen, Y., ... Wu, G. (2015). Global analysis of gene expression profiles in physic nut (*Jatropha curcas* L.) seedlings exposed to drought stress. *BMC Plant Biology*, *15*(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0397-x>
- Zhang, Z., Ren, J. S., Clifton, I. J., & Schofield, C. J. (2004). Crystal structure and mechanistic implications of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase - The ethylene-forming enzyme. *Chemistry and Biology*, *11*(10), 1383–1394. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.08.012>

Zhong, G., Huberman, M., Feng, X. Q., Sisler, E. C., Holland, D., & Goren, R. (2001). Effect of 1-methylcyclopropene on ethylene-induced abscission in citrus. *Physiologia Plantarum*, 113(1), 134–141. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1130118.x>

Zhou, Z. Y. (2009, March 1). An overview of fossil Ginkgoales. *Palaeoworld*, Vol. 18, pp. 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.palwor.2009.01.001>

CAPÍTULO 3

Regulação da biossíntese de etileno em *Coffea arabica* durante o déficit hídrico, reirrigação e pulverização com 1-Metilciclopropeno

RESUMO

O fitohormônio etileno é um hidrocarboneto volátil com amplo efeito sobre diferentes aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas em níveis muito baixos de concentração. Entretanto, a exposição contínua a condições ambientais desfavoráveis regula a taxa de biossíntese do etileno, que depende da concentração intracelular e da capacidade de sensibilidade da planta ao hormônio para desencadear respostas rápidas. Durante a biossíntese, a S-adenosilmetionina é convertida em ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) pela enzima ACC sintase (ACS). Posteriormente, a enzima ACC oxidase (ACO) converte o precursor ACC em etileno. As etapas consideradas limitantes para produção do etileno são coordenadas por essas enzimas que são codificadas por famílias multigênicas. A percepção do hormônio pela planta é um fator crucial e o transporte do sinal através dos componentes a jusante dos receptores controla as alterações morfológicas e fisiológicas. O fino ajuste requerido entre o etileno e seus receptores foram explorados para o desenvolvimento de moléculas capazes de retardar as respostas ao etileno em espécies de interesse agrônomico. O 1-Metilciclopropeno (1-MCP) é um potente antagonista da ação do etileno, mas trabalhos anteriores mostraram regulação controversa do 1-MCP sobre a biossíntese do etileno em diferentes espécies. Recentemente foi comprovado que em *Coffea arabica* o 1-MCP regula positivamente a expressão de genes das vias de biossíntese e sinalização. A partir desse resultado, uma conexão foi sugerida entre a regulação do metabolismo do etileno durante o florescimento de *Coffea arabica*. Entretanto, questões importantes sobre os estímulos para expressão diferencial dos genes ainda permanece sem explicação. Para obter evidências sobre as modificações nos níveis de etileno que podem estar associados a promoção da antese, objetivou-se com esse estudo analisar a regulação gênica das vias de biossíntese e sinalização do etileno, bem como determinar a produção de etileno em cafeeiros submetidos a diferentes condições hídricas e pulverizados com 1-MCP. O experimento foi conduzido em sala de crescimento com condições controladas utilizando mudas de *Coffea arabica*. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos (irrigado, déficit hídrico, reirrigado, irrigado+1MCP, déficit hídrico+1MCP) e cinco repetições biológicas. Foram feitas análises de potencial hídrico foliar e trocas gasosas durante o período experimental. A análise da expressão dos onze genes alvos em diferentes tecidos foi feita utilizando RT-qPCR. Os resultados demonstram que o 1-MCP incrementa os níveis de etileno foliar e possivelmente um mecanismo de retroalimentação pela perda do *feedback* negativo seja responsável por regular a expressão diferencial das enzimas da biossíntese. A enzima ACO foi frequentemente regulada pelo 1-MCP e o receptor CarETR1-like foi reprimido em resposta ao 1-MCP. Finalmente, foi sugerido que a enzima ACO desempenha um importante papel nesse processo e que a via de percepção é o ponto crucial do metabolismo do etileno em plantas sob déficit hídrico.

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

ABSTRACT

The ethylene is a plant hormone that is involved in the regulation of a several developmental processes of plant growth and plant senescence depending in a very low levels of concentration. However, continuous exposure to unfavorable environmental conditions regulate the biosynthesis rate of ethylene production, which depends on the intracellular concentration and the ability of the plant to be sensitive to the hormone and trigger rapid responses. During ethylene biosynthesis, S-adenosylmethionine is converted to acid-1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) by the enzyme ACC synthase (ACS). Subsequently, the enzyme ACC oxidase (ACO) converts the precursor ACC into ethylene. The stages considered keys for ethylene production are coordinated by these enzymes that are encoded by multigenic families. The hormone perception by the plant is important and the signaling through the components downstream of the receptors promotes morphological and physiological changes. The fine adjustment required between ethylene and its receptors has been explored by the development of molecules capable of delay responses to ethylene in species of agronomic interest. 1-Methylcyclopropene (1-MCP) is an antagonist of the ethylene action in plants, results of previous researches has shown controversial regulation of 1-MCP on the ethylene biosynthesis in different species. Was recently demonstrated that in *Coffea Arabica*, 1-MCP regulates positively the gene expression in the ethylene biosynthesis and signaling pathways. This results suggests the regulation of ethylene metabolism during the flowering process in *Coffea arabica*. However, important questions about stimuli for differential gene expression still remain unexplained. In this study, the objective was to analyze the genetic regulation of ethylene biosynthesis and signaling pathways, as well as to determine ethylene production in coffee plants under different water conditions and 1-MCP application, to obtain evidence about changes in ethylene level associated with the promotion in coffee anthesis. The experiment was carried out in a growth room under controlled conditions using *Coffea arabica* seedlings. A completely randomized design was used, with five treatments (weel water, water deficit, rewater, well water+1MCP, water deficit+1MCP) and five biological replicates. Analysis of leaf water potential was performed during the experimental period. Analysis expression of eleven target genes in different tissues was performed using RT-qPCR. The results demonstrate that 1-MCP increases leaf ethylene levels and possibly a feedback mechanism due to the loss of negative feedback regulate the differential expression of biosynthesis enzymes. The ACO enzyme was frequently regulated by 1-MCP and the gen *CaETR1-like* receptor was repressed in response to 1-MCP. Finally, it has been suggested that the ACO enzyme plays an important role in this process and the pathway of perception is the most important of ethylene metabolism in plants under water deficit.

Keywords: Coffee tree. 1MCP. Flowering.

1 INTRODUÇÃO

O fitohormônio etileno (C₂H₄) é um hidrocarboneto volátil com amplo efeito sobre diferentes aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas (ABELES & MORGAN, 1992), modulando a capacidade de resposta a ataques de patógenos (HUANG et al., 2016; WANG et al., 2020) e estresses abióticos (HARTMAN et al., 2020; HU et al., 2020; YANG et al., 2004; YU et al., 2015). A exposição contínua a condições ambientais desfavoráveis regula a taxa de biossíntese do etileno, que depende da concentração intracelular e da capacidade de sensibilidade da planta ao hormônio para desencadear respostas rápidas (ARRAES et al., 2015; BRADFORD & TREWAVAS, 1994; HABBEN et al., 2014; SUN et al., 2016).

A via de biossíntese do etileno requer a conversão da metionina em S-adenosilmetionina que é, subsequentemente, convertida em ácido-1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) pela enzima ACC sintase (ACS). O ACC é o precursor direto do etileno e a ACC oxidase (ACO) é a enzima que assegura a transformação do ACC em etileno (YANG & HOFFMAN, 1984). No entanto, apenas duas etapas são consideradas limitantes para produção do etileno: as etapas coordenadas pelas enzimas ACC sintase (ACS) e ACC oxidase (ACO) (Bidonde et al., 1998; Bradford, 2008). Após sua produção, o etileno requer a percepção pelo tecido através do estabelecimento de ligação com os receptores localizados nos retículos endoplasmáticos (CAVASINI, 2013; CHEN et al., 2002). A junção do etileno ao sítio dos receptores funciona como um mecanismo de “chave-fechadura” (BLANKENSHIP, 2001), onde a detecção da presença do hormônio desbloqueia a atividade regulatória negativa que os receptores exercem sobre a proteína cinase *Constitutive Triple Response 1* (CTR1) (HUA & MEYEROWITZ, 1998). Alterações conformacionais desativam a repressão causada pela CTR1 no elemento regulador *Ethylene Insensitive 2* (EIN2) (ALONSO et al., 1999; KIEBER et al., 1993), promovendo o fluxo da cascata da transdução de sinal com a ativação dos fatores primários de transcrição *Ethylene Insensitive 3* (EIN3) ou *Ethylene Insensitive 3-like* (EIL) (QIAO et al., 2012; SOLANO et al., 1998; WEN et al., 2012; YOKOTANI, 2003). Esses elementos são essenciais na etapa regulatória e a mutação desses componentes causa completa insensibilidade ao etileno (ALONSO et al., 2003). Finalmente, os eventos nucleares específicos do EIN3/EIL induz fatores de transcrição secundários (JU et al., 2012; SOLANO et al., 1998) como o *Ethylene Response Factor* (ERF). Os ERFs pertencem a superfamília AP2/ERF (LIU et al., 2014; PIRRELLO et al., 2012; RIECHMANN et al., 2000) e ligam-se á regiões promotoras específicas de genes que possuem resposta ao etileno (DUBOUZET ET AL., 2003; LI ET AL., 2007; OHME-TAKAGI & SHINSHI, 1995; PIRRELLO et al., 2012).

No geral, a via de sinalização é linear e o transporte do sinal através dos componentes a jusante dos receptores controla as alterações morfológicas e fisiológicas em condições favoráveis e desfavoráveis ao crescimento e desenvolvimento da planta. Em muitas espécies as enzimas ACS e ACO são codificadas por famílias multigênicas que exibem padrão de expressão espaço-temporal único ou sobreposto (ARRAES et al., 2015; SEYMOUR et al., 2013; TSUCHISAKA & THEOLOGIS, 2004a; TSUCHISAKA et al., 2009; YAMAGAMI et al., 2003), assim como os receptores integram duas sub-famílias distintas quanto a quantidade de motivos de histidina (KLEE & TIEMAN, 2002; LIN et al., 2009; O'MALLEY et al., 2005). Baseados no modelo de *Arabidopsis thaliana*, os receptores ETR1 e ERS1 pertencem a sub-família 1 e ETR2, ERS2 e EIN4 á sub-família 2. Essa diferença não altera a atividade biológica dos receptores, que possuem função redundante (BLEECKER et al., 1998; HALL et al., 2000; LACEY & BINDER, 2014B). A complexidade na compreensão dos eventos associados ao etileno resulta, em parte, dos mecanismos de retroalimentação da biossíntese. Um exemplo é a regulação do amadurecimento do tomate que resulta da síntese autocatalítica mediada pela expressão dos genes *ACS2*, *ACS4*, *ACO1* e *ACO4* (BARRY & GIOVANNONI, 2006). O fino ajuste requerido entre o etileno e seus receptores foram explorados para o desenvolvimento de moléculas capazes de retardar as respostas ao etileno em espécies de interesse agrônômico (WATKINS, 2006). O 1-Metilciclopropeno (1-MCP) é um potente antagonista da ação do etileno (FENG et al., 2004; ÖZKAYA et al., 2016; PAK DEK et al., 2018; SEREK & SISLER, 2001; SISLER et al., 1999) capaz de se ligar de modo irreversível aos receptores do etileno promovendo, uma relação competitiva com o hormônio (BLANKENSHIP & DOLE, 2003; WATKINS, 2008). Esses aspectos somados á rápida difusão nos tecidos vegetais propagou o 1-MCP (C₂H₆) comercialmente, sobretudo no pós-colheita de vegetais e culturas ornamentais (GALATI et al., 2017; HA et al., 2019; TOIVONEN & LU, 2005)

Entretanto, trabalhos anteriores mostraram regulação controversa do 1-MCP sobre a biossíntese do etileno (ELLA et al., 2003; GEHL et al., 2019; TRIVELLINI et al., 2011) e recentemente foi comprovado que em *Coffea arabica* o 1-MCP regula positivamente a expressão de genes das vias de biossíntese e sinalização. A partir desse resultado, uma conexão foi sugerida entre a regulação do metabolismo do etileno durante o florescimento de *Coffea arabica* (LIMA, 2015; SANTOS, 2016). De acordo com a fenologia reprodutiva dessa espécie (CAMARGO & CAMARGO, 2001), modificações na comunicação entre raiz-parte aérea, após seca seguida por reidratação, poderia atuar como mecanismo para controlar a antese (CRISOSTO et al., 1992). O ACC, molécula solúvel em água e facilmente transportado na planta (BRADFORD & YANG, 1980; GÓMEZ-CADENAS et al., 1996; MORRIS &

LARCOMBE, 1995; TUDELA & PRIMO-MILLO, 1992) foi sugerida como o sinal para a promoção da antese em *Coffea arabica* (LIMA, 2015). Essa hipótese é suportada pela consideração de que em algumas espécies o etileno é o indutor da abertura floral (JONES; WOODSON, 1997; TANG; WOODSON, 1996). Em outros casos, há alterações na produção de etileno durante a antese, como a superexpressão da *ACO2* de *Arabidopsis thaliana* (VAN ES et al., 2018). Na última década, estudos direcionados a identificação e caracterização de prováveis genes do etileno em *Coffea arabica* (LIMA et al., 2011; SÁGIO et al., 2014) tem fornecido suporte para melhor compreensão das vias do etileno nessa espécie e muito recentemente a família gênica das *ACS* e *ACO* foi reavaliada (*capítulo 2*).

Entretanto, questões importantes sobre os estímulos para expressão diferencial dos genes ainda permanece sem explicação. Ainda que alguns grupos de pesquisa tenham buscado compreender o papel do etileno no desenvolvimento floral, os mecanismos moleculares que coordenam a indução da antese ainda não estão nítidos (LIN et al., 2009; LI et al., 2016). Até o presente, não está suficientemente esclarecido como o controle hormonal atua na regulação dos diferentes processos relacionados ao florescimento do cafeeiro e qual a relação e o mecanismo de ação do etileno nesse evento. Para obter evidências sobre as modificações nos níveis de etileno que podem estar associados a promoção da antese, objetivou-se com esse estudo analisar a regulação gênica das vias de biossíntese e sinalização do etileno, bem como determinar a produção de etileno em cafeeiros submetidos a diferentes condições hídricas e pulverizados com 1-MCP.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condições de crescimento das plantas

Mudas de *Coffea arabica* cv Catuaí 144, obtidas da Fundação Procafé (Varginha-MG, Brasil), cultivadas em sacos de polipropileno (20x11 cm) foram transplantadas para vasos de 6L contendo mistura de solo, areia e adubo (2:1:1, v/v/v), sendo que o adubo era composto de NPK (4:14:8). Durante o desenvolvimento as mudas foram cultivadas em casa de vegetação recebendo os tratos culturais adequados. Quando completaram 10 meses e possuíam 9 pares de folhas, as plantas foram transferidas para câmaras em sala de crescimento onde o experimento foi conduzido sob condições controladas: fotoperíodo de 12h a 25°C. A câmara era composta por prateleiras de 1,20x1,20 contendo 18 lâmpadas de LED de 18W que forneciam 300 μ mol m⁻² s⁻¹ de densidade de fluxo de fótons.

2.2 Tratamentos e amostragem das plantas

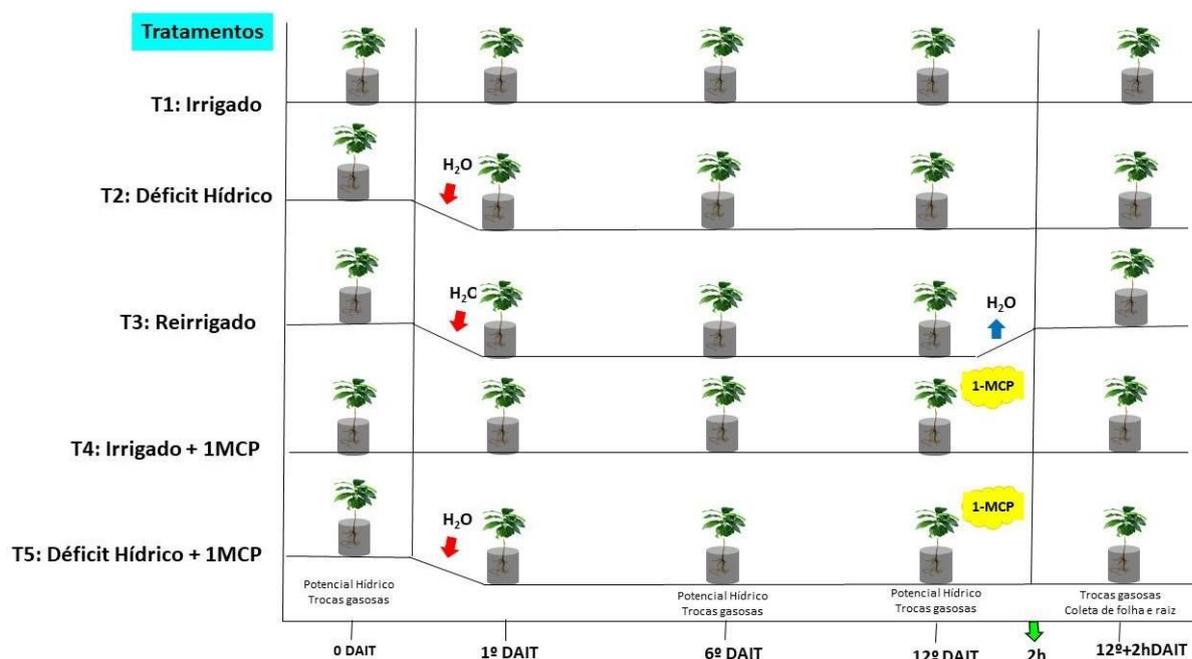
Na sala de crescimento as plantas foram acondicionadas em duas câmaras isoladas por cortina blackout de PVC para garantir o período de escuro (12h) e minimizar a deriva dos tratamentos que incluíam pulverização com 1-MCP. Foi adotado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 5 tratamentos (Figura 18) e 5 réplicas biológicas: 2 para análises fisiológicas e 3 para coleta de material vegetal. Os tratamentos com e sem pulverização de 1-MCP foram distribuídos nas câmaras 1 e 2, respectivamente. Em cada câmara as plantas foram distribuídas nas prateleiras considerando a condição hídrica. Tratamentos com plantas bem hidratadas (T1 – Irrigado; T4 – Irrigado+1MCP) foram acondicionados nas prateleiras inferiores para assegurar que o escoamento da água após a irrigação não iria interferir nos tratamentos de restrição hídrica. Portanto, plantas submetidas ao déficit hídrico (T2 – déficit hídrico; T3 – déficit hídrico+reirrigado; T5 – déficit hídrico+1MCP) foram mantidas nas prateleiras superiores nas duas câmaras. O T2 e T3 foram mantidos juntos na prateleira superior da câmara 2 até o momento da reirrigação do T3.

Durante sete dias todas as plantas foram irrigadas diariamente mantendo-se o nível de água do solo em 100% da capacidade de campo (CC máxima). Esse procedimento foi realizado para todos os vasos antes da imposição dos tratamentos e a reposição da água, quando necessária, era realizada ao final do dia. A capacidade de campo foi calculada, com auxílio de uma balança, a partir da diferença entre o peso seco e o peso encharcado do solo, após o escoamento total da água. Ao final desse período o estresse foi imposto nos tratamentos com déficit hídrico pela suspensão total da irrigação no T2 e T3 até que as plantas atingissem o potencial hídrico foliar (ψ_{wr}) antemanhã de, no mínimo, -3,0 Mpa (LIMA et al., 2015). No T5, as plantas foram mantidas com 50% da capacidade de campo. Esse método foi adotado para garantir a eficiente absorção do 1-MCP após a pulverização das folhas. Portanto, esse tratamento foi irrigado parcialmente e o ψ_{wr} mantido em -2,0 Mpa. Nesse estudo, plantas bem irrigadas (T1 e T4) foram mantidas sob CC máxima durante todo o período experimental enquanto as plantas dos tratamentos de estresse foram submetidas ao déficit hídrico sete dias após irrigação constante. Para o tratamento com reidratação, as plantas foram submetidas a 1 ciclo de déficit hídrico e novamente irrigadas, retornando a CC máxima. A reirrigação e a pulverização do 1-MCP foram realizadas somente após a redução no potencial hídrico foliar, como descrito anteriormente, aos 12 dias após a suspensão da irrigação.

A dosagem de 1-MCP foi determinada por Lima (2015) a pulverização foi realizada com auxílio de borrifador, dentro da câmara 1 com as cortinas fechadas. Cada planta recebeu 20mL da calda composta por 390 μ L de 1-MCP contendo 3,8% de ingrediente ativo (produto

comercial HarvistaTM – AgroFresh) acrescidos de 70 μ L surfactante Break-Thru (Evonik Industries AG, Essen, Alemanha) na concentração de 0,025 v/v. O volume foi completado com água e a calda foi preparada no momento da aplicação, sendo que a pulverização abrangeu as regiões adaxial e abaxial das folhas. No tratamento com déficit hídrico, a superfície dos vasos foi coberta com lona plástica para proteção do solo. Concomitantemente a pulverização do T4 e T5, ocorreu a reirrigação no T3 e, duas horas após, foram coletadas amostras de folha e raiz para determinação da produção de etileno e análise da expressão gênica por RT-qPCR em todos os tratamentos.

Figura 18 – Esquema do delineamento experimental das mudas de *Coffea arabica*.



Legenda: Croqui do experimento conduzido com mudas de *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelha 144. DAIT – Dia Após Imposição dos Tratamentos.

Fonte: Do autor (2020).

2.3 Parâmetro fisiológico

Dois réplicas biológicas, em cada tratamento, foram utilizadas para análises do potencial hídrico foliar e utilizadas como padrão comparativo para as três réplicas biológicas utilizadas para coleta de material vegetal. O experimento foi avaliado no dia 0 (zero) da imposição do estresse, quando todas as plantas ainda estavam na CC máxima, e nos 6º e 12º dia após a imposição dos tratamentos (DAIT). O 12º dia das análises fisiológicas determinou o término do experimento. A duração do período experimental considerou os valores do ψ_{wf} e, a

seleção dos dias de avaliação para o ψ_{wf} , após a suspensão da irrigação, considerou a intensidade de murcha das folhas. No último dia do experimento, aos 12 dias de déficit hídrico, a análise do potencial hídrico foliar foi realizada na madrugada e a análise de trocas gasosas pela manhã, antes e 2 horas após a reirrigação no T3 e pulverização no T4 e T5. Nas avaliações do potencial hídrico, as medições foram realizadas com câmara de pressão (PMS *Instruments-Plantmoisture*- Modelo 1000) tipo Scholander (SCHOLANDER et al., 1965) em três folhas completamente expandidas localizadas entre o 3º e 5º nó, contados a partir do ápice, entre 3h e 5h da manhã.

2.4 Determinação da produção de etileno

Três réplicas biológicas foram usadas para medir a produção do etileno. Cada réplica biológica forneceu duas repetições técnicas, e cada repetição técnica resultava da junção de dois tubos contendo os órgãos analisados. Para folha, quatro unidades completamente expandidas foram pesadas e armazenadas, individualmente, em tubo de vidro de 10ml. Para raiz, a planta foi retirada do vaso e o tecido radicular foi lavado para retirada do solo residual. Em seguida, 0,5g de raiz foi pesada e armazenada como descrito acima. Os tubos foram selados com septo de borracha e incubados à temperatura ambiente por 24h. Amostra de gás de 3mL de cada um dos tubos que representavam uma repetição técnica foi coletado com seringa hipodérmica, então, 6mL do gás foi injetado no analisador portátil de etileno (CI-900, CID Bio-Science) para medição da concentração do etileno. Cada experiência foi repetida duas vezes para garantir a confiabilidade dos dados.

2.5 Extração de RNA total e Síntese de cDNA

A extração de RNA foi realizada utilizando o protocolo de Chang et al (1993) com adaptações para tecidos de café. Após a extração, 1,5 μ L RNA foi quantificado em espectrofotômetro (Nanovue[®]) determinando-se a quantidade e a qualidade do material extraído. Para determinar a integridade do RNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com SYBR[®] Safe DNA Gel Stain 400 μ L e visualizado em fotodocumentador UV-transilluminator (UVITEC FireReader XS D-77Ls-20. M). Visando a eliminação do DNA residual, as amostras foram tratadas com o Turbo DNA-free[™] kit (Ambion), seguindo as recomendações do fabricante. Para avaliação da integridade das amostras foi realizado o mesmo procedimento descrito anteriormente. As amostras que apresentaram alto grau de integridade e pureza foram utilizadas para a síntese de cDNA utilizando o Kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), seguindo

a recomendação do fabricante. A reação para síntese de cDNA foi realizada em termociclador (Multigene Gradient – Labnet) nas seguintes condições de ciclagem: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C e 5 minutos a 85°C. Após a síntese do cDNA, as amostras foram armazenadas em freezer a -20° C.

2.6 Análise de sequências

Os genes que codificam enzimas na biossíntese de etileno e nas vias de resposta em *Arabidopsis thaliana* foram recuperados do banco de dados KEGG (AOKI & KANEHISA, 2005). Cada uma dessas sequências de proteínas desses genes foi usada como entrada para realizar buscas de similaridade com os genomas de espécies vegetais de diferentes ordens, como *Solanales*, *Gentianales*, *Brassicales*, *Cucurbitales*, *Rosales*, *Fabales*, *Malpighiales*, *Vitales*, *Poales*, *Amborellales*, *Ginkgoales* e a samambaia *Selaginella moellendorffii*. Essas pesquisas foram feitas com BLAT (versão 36x2) (KENT, 2002). Os dois melhores resultados (maior número de correspondências) para cada enzima mapeada para cada genoma tiveram suas coordenadas genômicas expandidas em 1500 pares de bases nas duas direções genômicas. Essas coordenadas genômicas foram então inseridas na ferramenta de previsão gênica Augustus (versão 3.3.2) (STANKE & MORGENSTERN, 2005) para identificar possíveis genes nesses genomas. Todas as sequências de proteínas previstas para uma enzima específica foram submetidas a um filtro de comprimento e apenas proteínas com comprimento superior a 70% da sequência inserida por *Arabidopsis thaliana* foram consideradas para mais etapas. Além disso, removemos da análise as proteínas previstas cuja sequência inserida estava abaixo de 70% de seu comprimento. As demais sequências previstas e a sequência inserida para cada enzima foram então alinhadas com o MAFFT (versão 7.427) (KATO & TOH, 2008) através da orientação do *script perl* (versão 2.02) (Sela et al., 2015). Apenas uma enzima por espécie foi relatada com base em múltiplas interações da análise filogenética com o pacote de orientação *Phylip* (versão 3.698) (FELSENSTEIN, 1993). Finalmente, as sequências de proteínas de *Coffea arabica* e *Coffea canephora* foram alinhadas com as sequências de plantas no banco de dados do NCBI por meio da ferramenta online BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) disponível em (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Esta etapa foi realizada para verificar se a proteína prevista é homóloga de qualquer proteína depositada no banco de dados NCBI.

2.7 Desenho de primers

Primers selecionados para os genes da via de percepção e sinalização foram projetados usando a ferramenta OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies; <https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) a partir das sequências identificadas na análise *in silico* desses estudos (Tabela 2). A eficiência de amplificação desses iniciadores e a seleção dos genes de referência *AP47* e *RPL39* foram executados de acordo com (FERNANDES-BRUM et al., 2017). As sequências para os genes da biossíntese *CarACS3-like* e *CarACS7-like* foram selecionadas pelo nosso estudo anterior (capítulo 2). Para os genes *CaACS1-like*, *CaACO1-like*, *CaACO4-like*, *CaACO5-like* as sequências utilizadas na detecção de amostras de oligonucleotídeos foram selecionados do estudo de (SÁGIO et al., 2014).

Tabela 2 – Iniciadores específicos dos genes utilizados para amplificação de fragmentos de cDNA via RT-qPCR.

Gene	Sequência de Primer (5' – 3')	Concentração (μ M)	Volume (μ L)	Tm ($^{\circ}$ C)	E (%)
<i>ETR1-like</i>	F:GATGGGTGCTTGTGCAGTTT R: AGCATTAGAGCTGTCGCACAT	2	3,0	56,3 56,8	97
<i>EIN4-like</i>	F:TATTTGGGACTGGGGTTTGGG R: AGCAGCCCCTTTTCAATCCAT	2	3,0	57,3 57,3	100
<i>CTR1-like</i>	F:TAAGCCAACCGAAACCTCCTG R: TGGAAACCCTAAAAGCAGCCAT	2	3,0	57,2 57,2	91
<i>EIL1-like</i>	F:TTCCCGAATGAAGTTTACTG AA R: GTGAAAAGTGTCTGGCTGCTG	2	3,0	55,0 56,9	93
<i>ERF1-like</i>	F:CACAAGCACAGGCTGTTCAA R: TCTTGGGTTTTTCTTCGGGCT	2	3,0	56,2 57,0	100

Fonte: Do autor (2020).

2.8 Análise da expressão gênica via RT-qPCR

Para determinar o padrão de expressão de 11 genes relacionados com a biossíntese, percepção e sinalização do etileno, uma análise de RT-qPCR dos níveis de transcrição foi realizada utilizando primers gene-específico. Essas análises foram realizadas com três réplicas biológicas em triplicatas técnicas para cada uma das amostras, com volume final por reação de 15 μ L. Foi utilizado 1,5 μ L de cDNA e 13,5 μ L de Mix contendo 7,5 μ L de SYBR (QuantiFast SYBR Green PCR Kit – Qiagen) e 3,0 μ L de cada primer. O termociclador Rotor-Gene Q Real-Time PCR (Venlo, Holanda) portando sistema de detecção SYBR[®] Green foi utilizado com os seguintes parâmetros: 5 min a 95 $^{\circ}$ C, 40 ciclos de 5 s a 95 $^{\circ}$ C e 10 s a 60 $^{\circ}$ C, finalizando com

uma curva de melting para análise da especificidade da reação, aumentando-se a temperatura de 60 °C a 95 °C, com o aumento de 1 °C a cada 5 s. No entanto, para o CaACS1 os 40 ciclos ocorreram nas temperaturas de 95°C e 58°C, respectivamente.

2.9 Análise Estatística

Os dados referentes aos parâmetros fisiológicos e determinação do etileno foram submetidos à análise de normalidade pelos testes Shapiro-Wilk ($P \geq 0,05$) e Bartlett ($P \geq 0,05$) para verificar a homocedasticidade das variâncias. Os dados considerados normais e demonstrando homogeneidade de variância foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Os efeitos entre tratamentos foram inclusos no modelo. Quando as diferenças foram detectadas pela ANOVA, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott (1974) ($P < 0,05$), usando o software R (R core team 2019) e o ExpeDes (FERREIRA et al. 2018), e pacotes ggplot 2 (WICKHAM 2009).

A expressão relativa dos genes foi calculada pelo método $\Delta\Delta CT$ (PFAFFL, 2001) usando os genes de referência *AP47* e *RPL39* (Tabela 2). Os cálculos da razão de expressão e os intervalos de confiança foram submetidos a análise estatística com modelo linear misto Steibel et al (2009). O modelo é dado pela equação:

$$y_{iklm} = \mu + TG_{ik} + II + e_{ijklm}$$

em que y_{iklm} é o Cq (ciclo de quantificação) obtido do software do termociclador para o k-ésimo gene (referência ou alvo) do m-ésimo poço, correspondente à l-ésima planta sujeita ao i-ésimo tratamento (IR, DH, REIR, IR+1MCP, DH+1MCP); TG_{ik} é o efeito da combinação do i-ésimo tratamento (IR, DH, REIR, IR+1MCP, DH+1MCP) na expressão do gene k (referência ou alvo); em que a combinação do i-ésimo (folha ou raiz) e o j-ésimo (IR, DH, REIR, IR+1MCP ou DH+1MCP); $II \sim N(0, \sigma^2_{lk})$ é um efeito aleatório específico da planta; e $e_{ijklm} \sim N(0, \sigma^2)$ é um termo residual.

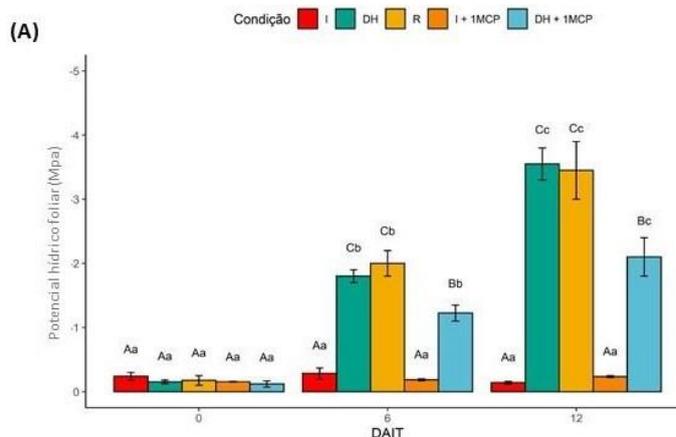
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises Fisiológicas

O experimento foi conduzido com três condições hídricas distintas: bem irrigado, déficit hídrico e déficit hídrico seguido por reidratação. Inicialmente, todas as plantas foram mantidas em capacidade de campo máxima (100%). A análise do potencial hídrico foliar mostrou que antes da imposição dos tratamentos hídricos, dia 0 após imposição dos tratamentos (DAIT), todas as plantas apresentavam valores superiores a $-0,3\text{MPa}$, não havendo diferença entre os tratamentos (figura 19A). Após a medição do potencial hídrico, no dia 0, a irrigação foi totalmente suspensa nos tratamentos 2 (Déficit hídrico) e 3 (Reirrigados). No 6º DAIT, a restrição de água reduziu os potenciais hídricos nos tratamentos 2 e 3 para até $-2,2\text{MPa}$, atingindo até $-3,8\text{MPa}$ no 12º DAIT. Para o tratamento 5 (Déficit hídrico + 1MCP) a irrigação foi parcialmente suspensa, mantendo-se 50% da capacidade de campo dessas plantas que receberiam a pulverização do 1-MCP via foliar. Nos tratamentos 1 (Irrigado) e 4 (Irrigado + 1MCP), os valores dos potenciais hídricos foram mantidos acima de $-0,3\text{MPa}$ em decorrência da reposição diária da água perdida por transpiração. A alteração na rega promoveu diferença significativa entre os tratamentos, dentro de cada tempo, a partir do 6º DAIT e esse padrão foi mantido até o 12º+2h DAIT.

Para as plantas do Déficit Hídrico e do Reirrigado, os valores de potenciais foram similares no 6º e 12ºDAIT, mas ambos diferiram do tratamento de Déficit hídrico+1MCP (figura 19). É notável que as plantas deste último tratamento estavam submetidas ao déficit hídrico, uma vez que ao se comparar os valores dos potenciais hídricos dos tratamentos irrigados houve diferença entre as condições hídricas. Entretanto, a manutenção da irrigação parcial manteve a capacidade de campo abaixo do obtido nas plantas constantemente irrigadas, mas acima do observado nas plantas com suspensão total da irrigação. De modo geral, o acompanhamento do status hídrico foliar permite afirmar que a restrição de água conduziu as plantas dos tratamentos 2, 3 e 5 a uma situação de estresse, visível pela murcha das folhas em decorrência da redução na turgescência celular máxima. No entanto, no tratamento 5, o sintoma de murcha foliar foi menos intenso devido a diferença na intensidade do déficit hídrico imposto.

Figura 19 – Medidas fisiológicas de potencial hídrico foliar.



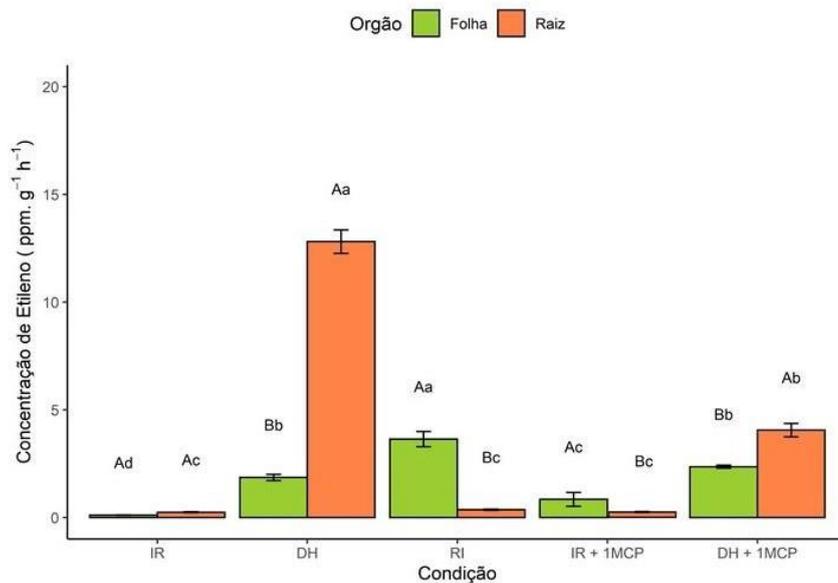
Legenda: Letras maiúsculas comparam os tratamentos dentro de cada tempo e letras minúsculas comparam cada tratamento no tempo (0,6,12 e 12+2h). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). As barras indicam o erro padrão da média de duas repetições.

Fonte: Do autor (2020).

3.2 Produção de etileno

Analisando o tratamento irrigado, a produção de etileno não diferiu entre os órgãos e obteve o máximo de $0,21 \text{ ppm g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (figura 20). Isso mostra que a concentração de etileno em plantas constantemente bem hidratadas permaneceu em níveis basais, concordando com o comportamento desempenhado pelo etileno de atuar como um importante regulador de crescimento em concentrações muito baixas (ABELES & MORGAN, 1992; NEGI et al., 2008). Observando o tratamento de déficit hídrico, a restrição de água durante todo o período experimental elevou a concentração de etileno nessas plantas, especialmente na raiz ($12,81 \text{ ppm g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), que foi 6 vezes superior às folhas. Comparando esses tratamentos, a concentração de etileno nas folhas e raízes sob déficit hídrico foi 18 e 53 vezes maior (figura 20), respectivamente, do que em plantas irrigadas. Diferentes fatores ambientais são capazes de estimular a conversão de ACC em etileno e regular a taxa de biossíntese desse hormônio (YANG & HOFFMAN, 1984). A limitação na disponibilidade de água é um estímulo ambiental há muito reconhecido como modulador da produção de etileno (ABELES & MORGAN, 1992; BELTRANO et al., 1999; LESTARI et al., 2018). Entretanto, generalizar o padrão de regulação da biossíntese do etileno não é uma abordagem indicada pois, as espécies podem responder de maneira específica sob condição de seca e essa especificidade pode ser estendida aos órgãos (BELTRANO et al., 1999; LARRAINZAR et al., 2014; LIU et al., 2013; RICKES et al., 2019).

Figura 20 – Níveis de produção de etileno a partir de folhas e raízes de mudas de *Coffea arabica*.



Legenda: As barras representam a média e erro padrão de três repetições. Letras maiúsculas comparam os órgãos dentro de cada tratamento e letras minúsculas comparam o órgão nos diferentes tratamentos. Letras diferentes indicam diferenças significativas em $P < 0,05$ (teste de Scott-Knott). Tratamentos: IR - Irrigado, DH – Déficit Hídrico, RI - Reirrigado, IR+1MCP – Irrigado+1MCP, DH+1MCP – Déficit Hídrico+1MCP.

Fonte: Do autor (2020).

Nossos resultados demonstram que sob seca a via de biossíntese do etileno é superestimada nas raízes de *Coffea arabica*, as quais intensificam a produção de etileno, possivelmente como um mecanismo de resposta a perturbações severas. Quando a via de biossíntese é sobrerregulada, a tendência é que a via de sinalização responda positivamente ao aumento na concentração do etileno afim de desencadear as respostas fisiológicas e morfológicas (GEISLER-LEE et al., 2010). Em plantas sob seca, a elevação nos níveis de etileno promovem a redução da área foliar ao coordenar eventos de senescência e abscisão, mas também podem promover a inibição do crescimento da parte aérea e do sistema radicular (GÓMEZ-CADENAS et al., 1996; MIZUKAMI, 2001; PIERIK et al., 2006; SHARP, 2002). Essa pequena explosão localizada nos níveis de etileno pode ter ocorrido visando estagnar o crescimento das raízes, uma vez que, modificações no crescimento são ajustes característicos regulados pela via do etileno (ABELES & MORGAN, 1992; WOLTERS & JÜRGENS, 2009). No entanto, os processos de crescimento e desenvolvimento das plantas são controlados por inter-relações dos hormônios que podem interagir de diferentes maneiras (WOLTERS & JÜRGENS, 2009). O Ácido Abscísico (ABA) é um hormônio altamente induzido por condições de estresse (SCHACHTMAN & GOODGER, 2008; SEKI et al., 2007; WILKINSON et al.,

2012) e sintetizado na raiz (SHARP et al., 1994), mas facilmente translocado para regiões distantes do seu local de síntese (WANI et al., 2016). Durante o déficit hídrico, a comunicação entre ABA e etileno pode ser antagônica (GERTMAN & FUCHS, 1972; CHEN et al., 2013; RIOV et al., 1990; SHARP, 2002). já sendo constatada inibição da biossíntese do etileno na raiz por regulação do ABA (SPOLLEN et al., 2000).

No geral, a principal resposta do ABA sob déficit hídrico é a regulação do funcionamento dos estômatos, com o intuito de reduzir a perda de água na planta (SANGTARASH et al., 2009; SCHROEDER et al., 2001). Embora a determinação da concentração de ABA não tenha sido feita, as análises de trocas gasosas (figura 19B-D) comprovam que as plantas mantidas sem irrigação reduziram significativamente a condutância estomática a partir do 6º DAIT (figura 19C). Considerando que a quantificação do etileno foi realizada com material vegetal coletado no 12º DAIT, onde essas plantas exibiam potencial hídrico foliar de -3,8 (figura 19 A), há um forte indício de que a concentração de ABA estava elevada. Logo, constatado o aumento na concentração de etileno em folhas e raízes de *Coffea arabica*, existem duas situações possíveis: (i) o ABA não interferiu nas respostas de estresse hídrico e a elevação na biossíntese de etileno ocorreu por uma via independente do ABA, ou (ii) o etileno produzido foi regulado por uma via dependente do ABA, de modo que, ABA e etileno atuaram de forma sinérgica sob déficit hídrico.

As plantas reirrigadas apresentaram o maior volume de etileno nas folhas entre os tratamentos avaliados, enquanto as raízes obtiveram igual concentração em relação as plantas constantemente hidratadas, tratamentos irrigado e irrigado+1-MCP. As plantas reirrigadas foram submetidas a um ciclo de seca, havendo reidratação no 12º DAIT, enquanto as plantas do déficit hídrico foram mantidas sob seca contínua até o 12º+2h DAIT. Durante o período de seca não houve diferença entre os potenciais hídricos desses tratamentos (figura 19A), indicando que ambas estavam sob mesma condição de estresse hídrico. Portanto, supõe-se que até o 12ºDAIT as plantas do tratamento reirrigado possuíam o mesmo nível de etileno, nas raízes, que o verificado nas plantas do déficit hídrico constante. Após reidratação, com retorno á capacidade de campo máxima no 12º+2h DAIT, as plantas do reirrigado exibiram concentração de etileno, entre raiz-parte aérea, oposta ao encontrado nas plantas sob déficit hídrico contínuo. Sabendo que o etileno é um composto imóvel na planta (ABELES & MORGAN, 1992), a explosão de etileno nas folhas reirrigadas possivelmente foi promovido pelo seu precursor, produzido nas raízes durante a seca. Essa afirmativa é baseada na comparação do nível de etileno em folhas dos tratamentos irrigado e déficit hídrico. Embora a concentração de etileno em folhas no tratamento déficit hídrico tenha sido elevada em relação as plantas constantemente

irrigadas, nas folhas reirrigadas houve um aumento de 36 e 2 vezes na concentração do etileno comparados com os respectivos tratamentos. Portanto a raiz foi o local com maior atividade da biossíntese de etileno quando os cafeeiros foram submetidos á seca, contribuindo para o aumento foliar de etileno no tratamento reirrigado. O ACC, precursor do etileno, é solúvel em água e possui mobilidade á longas distâncias, via xilema, como mecanismos de resposta a diferentes tensões abióticas (BRADFORD & YANG, 1980; DAWOOD et al., 2016; VAN DER STRAETEN et al., 1997; VANDERSTRAETEN & VAN DER STRAETEN, 2017). Assim como detectado nesse estudo, em citros o déficit hídrico induziu a biossíntese de ACC nas raízes e a reidratação favoreceu o transporte do ACC através do fluxo de água pelo xilema. Essa resposta induzida pelo estresse seguido de água resultou na abscisão foliar coordenada pelo etileno (GÓMEZ-CADENAS et al., 1996; TUDELA & PRIMO-MILLO, 1992). Aqui, confirmamos que a reidratação restaurou os níveis de etileno nas folhas após a seca.

No 12º dia experimental também foi implementado o tratamento pela pulverização do 1-MCP em outros grupos de plantas mantidas sob irrigação e seca constante. Como esperado, não houve diferença no nível de etileno nas raízes de plantas irrigadas+1MCP quando comparadas com plantas irrigadas sem pulverização pois ambas mantiveram potencial hídrico de $-0,35\text{MPa}$ até o $12^\circ+2\text{hDAIT}$. A baixa concentração de etileno observada nas raízes desses tratamentos também foi similar ás raízes de plantas reidratadas e ambas diferiram dos dois grupos de plantas submetidos ao déficit hídrico até o $12^\circ+2\text{hDAIT}$, reforçando a ideia de que a água é o fator responsável por inibir a biossíntese de etileno na raiz. Quanto as folhas, houve diferença significativa na concentração de etileno do grupo irrigado+1-MCP em comparação com o grupo irrigado sem pulverização. A partir da confirmação dos baixos níveis de etileno nas raízes desses dois grupos de plantas devido ao status hídrico máximo, é possível afirmar que a elevação na concentração de etileno obtida sob irrigação constante foi promovida pelo 1-MCP. Esse resultado justifica a promoção da antese, antes da estação chuvosa, em cafeeiros com até $-0,49\text{MPa}$ após pulverização do 1-MCP, em condição de campo, antecipando a floração em relação aos demais tratamentos. Nesse caso, a expressão diferencial de genes da biossíntese e sinalização do etileno foi induzida pelo 1-MCP, indicando que possivelmente ocorreu aumento nos níveis de etileno após a pulverização (LIMA, 2015; SANTOS, 2016). O 1-MCP é classificado como um potente inibidor da ação do etileno (BLANKENSHIP & DOLE, 2003; SEREK, 1999; SEREK & SISLER, 2001), muito eficaz em retardar respostas de amadurecimento (PAK DEK et al., 2018; THONGKUM et al., 2018; WIN et al., 2019) e senescência (GALATI et al., 2017; GEHL et al., 2019; FAVERO et al., 2016). A ação antagonista reconhecida do 1-MCP foi refutada por Ella et al (2003) ao verificar que em folhas

de salsa houve aumento na biossíntese do etileno poucas horas após aplicação do 1-MCP e, de acordo com os autores, esse efeito poderia ser justificado pela perda do *feedback* negativo da biossíntese do hormônio.

A complexidade no metabolismo do etileno deve-se, em parte, aos mecanismos regulatórios da sua biossíntese. A produção de etileno endógeno pode ser regulada por uma via independente associada aos processos de crescimento e desenvolvimento (GRBIC & BLEECKER, 1995; SCHIEFELBEIN, 2000; YOUNG et al., 1997), tensões bióticas e abióticas (ABIRI et al., 2017; CHANG & BLEECKER, 2004; LESTARI et al., 2018; PIERIK et al., 2007; SHINOHARA et al., 2017), por regulação hormonal (KUROHA et al., 2018; ROBLES et al., 2013; SUBBIAH & REDDY, 2010) e por *looping de feedback* (O'DONNELL et al., 1996; ELLA et al., 2003; MULLINS et al., 2000; TRIVELLINI et al., 2011). Neste último, a via de biossíntese é regulada por mecanismo de retroalimentação induzindo a elevação nos níveis do hormônio (ELLA et al., 2003; INABA et al., 2007; TRIVELLINI et al., 2011; WILKINSON et al., 1997) a presença de etileno, a detecção do hormônio nos tecidos induz a produção autocatalítica regulada por *feedback* positivo, ou seja, a ligação do etileno aos seus receptores coordena uma cascata de sinalização para aumentar a síntese do etileno (JIANG; FUN, 2000; SEREK et al., 2006). Contrariamente, no *feedback* negativo a ligação do etileno aos receptores sinaliza para inibição da via de transdução e síntese de mais etileno. Porém, a perda do *feedback* negativo pela incapacidade de percepção dos níveis de etileno também é capaz de induzir a autocatálise do etileno (ELLA et al., 2003; TRIVELLINI et al., 2011; WATKINS, 2006). Possivelmente nesse estudo também ocorreu a perda do *feedback* negativo regulado pelo 1-MCP, aumentando significativamente a produção de etileno nas folhas irrigadas. Considerando que o 1-MCP tem elevada afinidade pelos receptores do etileno (SISLER & SEREK, 1997a) e sua ligação é competitiva e definitiva (SALEH-LAKHA et al., 2004; SISLER & SEREK, 1997b), a ocupação do sítio de ligação mantém os receptores estabilizados (KEVANY et al., 2007) mas incapazes de desativar a proteína *Constitutive Triple Response 1* (CTR1), que atua bloqueando os componentes de sinalização a montante da via (KIEBER et al., 1993; WEN et al., 2012). Tal mecanismo pode ter conduzido a planta à interpretação de que não havia etileno suficiente para desencadear processos fisiológicos necessários em condições ideais de crescimento, estimulando a biossíntese do hormônio. Nesse estudo, o método destrutivo de coleta não permitiu determinar se o aumento na concentração foliar de etileno após pulverização do 1-MCP promoveria danos a planta. No entanto, já foi comprovado que o 1-MCP não provoca a degradação de clorofila, senescência e abscisão foliar ou qualquer prejuízo aos órgãos da parte aérea (LIMA, 2015; SANTOS, 2016). Segundo os autores, embora a aplicação exógena de 1-

MCP estimule a produção de etileno, a biossíntese ocorre de maneira controlada pela planta, uma vez que esse produto não libera etileno instantaneamente sobre a planta.

A pulverização do 1-MCP também foi realizada no 12ºDAIT no grupo de plantas mantidas sob seca moderada, com potencial hídrico foliar de -2,2MPa. Comparando com a concentração de etileno foliar de plantas sob seca severa (-3,8MPa), não houve diferença significativa. Entretanto, nesse tratamento o nível de etileno foi inferior e superior as folhas dos tratamentos reirrigado e irrigado+1MCP, respectivamente. Ainda que o solo desse tratamento tenha sido mantido com metade da capacidade de campo, a produção de etileno na raiz foi superior ao encontrado nas folhas, sendo um indicativo da condição de estresse. Notavelmente, o 1-MCP não estimulou a biossíntese de etileno nas folhas de plantas com potencial hídrico acima de -2,0MPa. Interessantemente, a promoção da antese também foi induzida por 1-MCP em cafeeiros cultivados em campo e mantidos durante mais de 60 dias sem hidratação. Nessa condição, é possível que as plantas do campo estivessem em situação moderada de estresse e foi constatado que a expressão dos genes de biossíntese e sinalização também foram induzidos pelo produto (LIMA, 2015; SANTOS, 2016). Supostamente, o aumento diferencial na concentração de etileno em folhas sob déficit hídrico moderado não foi verificado nesse estudo em função da fase fenológica. Como demonstrado em trabalhos anteriores, a expressão diferencial de genes da biossíntese do etileno é regulada pela idade da planta (ROTTMANN et al., 1991; TSUCHISAKA & THEOLOGIS, 2004b). Então, supõe-se que em mudas de *Coffea arabica* o 1-MCP não estimule a produção de etileno sob seca, ainda que moderada, porque a sinalização emitida pelo etileno radicular indica que nessa fase não é favorável sobregular a produção do hormônio. Como o etileno via 1-MCP é produzido de maneira controlada, durante a fase vegetativa mecanismo regulatório por *feedback* negativo é mantido. Logo, esse seria um mecanismo exatamente oposto ao sugerido em plantas adultas que responderam positivamente ao 1-MCP durante o florescimento.

3.3 Análise da expressão gênica

3.3.1 Contraste: IR_IR1MCP

Em folhas, *CaACS1-like* foi o único gene regulado negativamente nas plantas irrigadas sem pulverização, enquanto que *CaACS3-like* e *CaACS7-like* não houve diferença significativa (figura 21A). A expressão de todos os genes *ACO* foi reduzida em comparação com folhas pulverizadas (figura 21B). Quanto aos prováveis receptores do etileno, *CaETR1-like* foi mais expresso nas folhas irrigadas enquanto que para o gene *CaEIN4-like*, não houve diferença na

expressão (figura 21C). O gene *CaCTR1-like* também foi diferencialmente expresso em folhas irrigadas, mostrando o padrão de expressão semelhante ao *CaETR1-like*. Entretanto, para *CaEIL1-like* e *CaERF1-like* a regulação foi positiva mais não houve diferença entre os tratamentos (figura 21D).

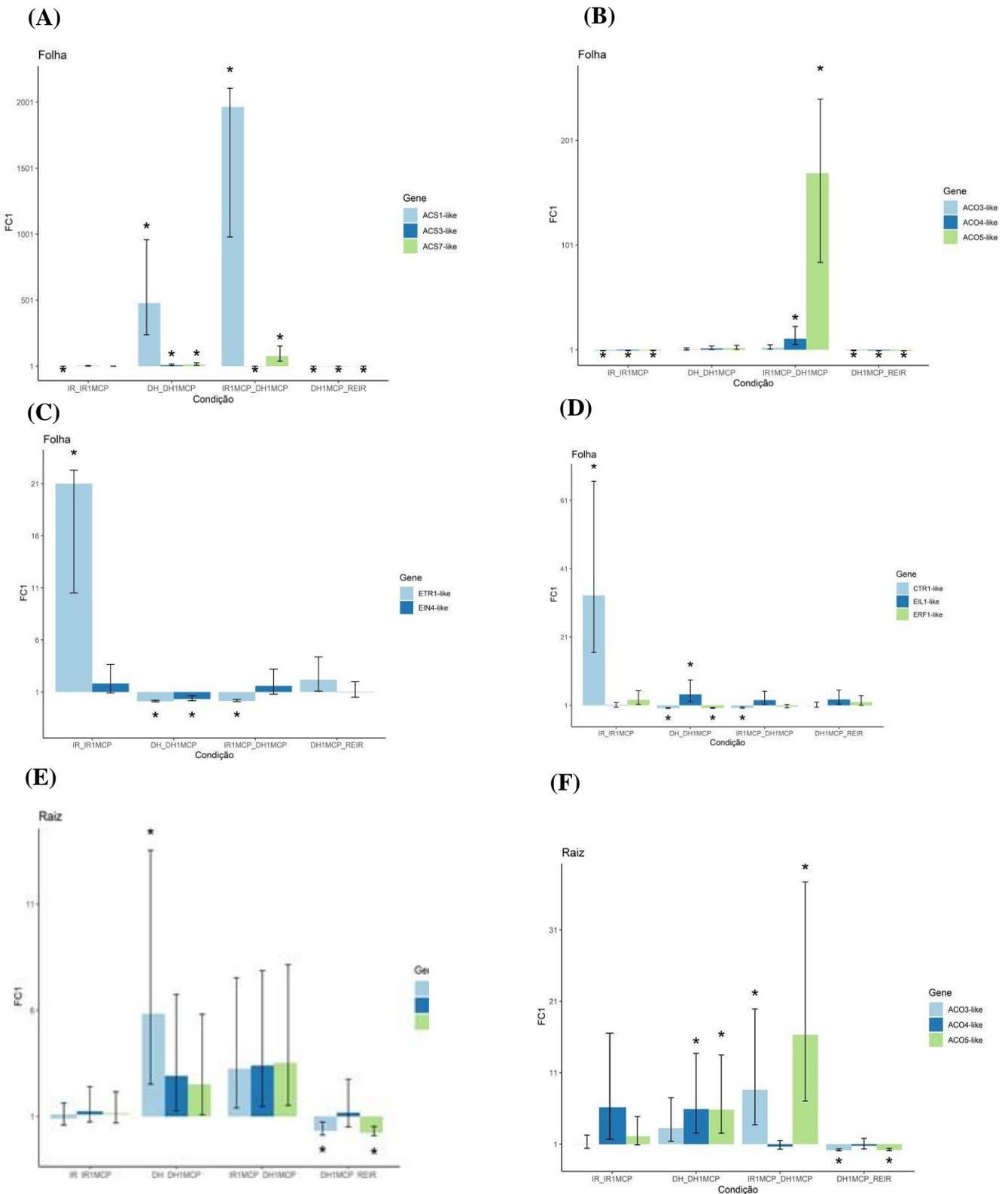
A expressão diferencial do *CaACS1-like* demonstra uma resposta específica ao produto, já que nessa comparação os dois grupos de plantas possuíam potencial hídrico similar (-0,35Mpa). É razoável supor que o incremento na produção de ACC das folhas irrigadas e pulverizadas são derivadas dos transcritos desse gene, já que os outros dois genes da ACS analisados demonstraram expressão dependente da condição hídrica. A partir da formação do ACC, o etileno parece ter sido produzido pela atividade conjunta das isoenzimas da ACO, devido a expressão sobreposta. Trabalhos anteriores relatam que a principal etapa limitante para síntese de etileno compreende a conversão do ACC regulado pela ACS (ADAMS et al., 1979; ARGUESO et al., 2007; WANG et al., 2004) mas a alteração a nível transcricional de todos os homólogos da ACO permite afirmar que essa enzima desempenhou importante papel na produção foliar de etileno em cafeeiros bem irrigados. Essa evidência é suportada por estudos que demonstraram que a ACO controlou a produção de etileno nas plantas (ENGLISH et al., 1995; LOVE et al., 2009; SHI & LIU, 2016). Ainda mais interessante é observar que esse incremento na produção de etileno foliar regulado pela ACO foi mediado pelo 1-MCP (figura 20). Resposta similar em folhas de citros (ZHONG et al., 2001) e de salsa (ELLA et al., 2003) também contrariaram as respostas amplamente descritas de alívio na biossíntese do etileno promovido pelo 1-MCP (MASSOLO et al., 2019; SISLER & SEREK, 1997a; WIN et al., 2019). A inconstância nas respostas encontradas nesses estudos não permite concluir qual ou quais os fatores direcionam o tipo de controle que o 1-MCP irá desenvolver. Mas, de fato, parece que a variação entre a regulação positiva ou negativa na biossíntese do etileno pelo 1-MCP parece depender da espécie, órgão, fase de desenvolvimento e diferentes estímulos.

Em *Coffea arabica*, durante o florescimento, aumento significativo na expressão de genes da biossíntese foi detectada em diferentes órgãos (LIMA, 2015; SANTOS, 2016) e juntamente com os dados desse estudo sugerem que nessa espécie, o 1-MCP influencia positivamente a produção do etileno. Os efeitos regulatórios são extrapolados para a via de sinalização e foi nítido que a existência de diferentes receptores é justificável pela ocorrência de respostas específicas. Assim como as enzimas de biossíntese, os receptores do etileno são codificados por pequenas ou grandes famílias multigênicas (BLEECKER et al., 1998; HUA & MEYEROWITZ, 1998). Esse contraste mostrou que em folhas de cafeeiros o 1-MCP regulou a expressão do receptor ETR1 enquanto o controle do EIN4 não foi dependente da condição

hídrica e do 1-MCP. No geral, os receptores são reguladores negativos da via de sinalização (BLEECKER et al., 1998) e é sugerido que o aumento na expressão gênica de receptores reduz a sensibilidade ao hormônio (THONGKUM et al., 2018; YANG et al. 2013). No entanto, não é possível afirmar que a quantidade de proteína ETR1 reduziu nas folhas pulverizadas (KEVANY et al., 2007) mas é um forte indício que o 1-MCP regula a expressão desse receptor. A transdução de sinal dessa via depende da comunicação entre os receptores e a proteína cinase CTR1 (GAO et al., 2003; HUANG et al., 2003). De fato, o aumento na expressão dessa proteína em folhas irrigadas está positivamente correlacionado com seu papel regulatório abaixo dos receptores e a montante da via, reduzindo a produção do etileno (figura 20). Apesar do efeito estimulador coordenado pelo 1-MCP nas folhas pulverizadas, a expressão constitutiva das proteínas EIL1 e ERF1 nos dois tratamentos pode ser correspondente a necessidade de respostas controladas pelo etileno durante a fase de crescimento da planta (SHI et al., 2006), especialmente em plantas jovens como é o caso desse estudo. Certamente devem existir mais receptores em *Coffea arabica* e é possível que a resposta desses membros seja diferente do que foi encontrado aqui. Mas, uma via de regulação proposta em cafeeiros bem hidratados durante o florescimento, enfoca a redução na expressão do ETR1 e CTR1 para aumentar a sensibilidade ao etileno e esse seria um segundo ponto de regulação para indução da antese regulado pelo 1-MCP. A primeira, seria a regulação positiva dos genes *ACO*. Com maior quantidade de etileno e menor quantidade de proteínas ETR1, seria possível saturar os sítios dos receptores insensíveis ao nível de expressão, como o *CarETR4-like* (SANTOS, 2016) e induzir a antese.

Nas raízes, como esperado, não houve diferença significativa na expressão dos genes *ACS* submetidos a mesmo potencial hídrico, mas apenas *CaACSI-like* foi regulado negativamente (figura 21E). Os genes *ACO* também não apresentaram expressão diferencial (figura 21F). A ausência de diferença para as duas principais enzimas da via de biossíntese entre os dois tratamentos confirma que o efeito do 1-MCP foi restrito as folhas pulverização. A elevada mobilidade do ACC permite o transporte desse precursor para regiões distantes do seu local de síntese (VANDERSTRAETEN & VAN DER STRAETEN, 2017) ou pulverização (MORRIS & LARCOMBE, 1995) mas aqui, provavelmente, não houve fluxo de ACC das folhas para raízes.

Figura 21 – As estimativas de mudança de dobra (FC) para cada contraste em folhas e raízes de mudas de *Coffea arabica*.



Legenda: Tratamentos – Irrigado (IR), Déficit Hídrico (DH), Irrigado+1MCP (IR_1MCP), Déficit Hídrico+1MCP (DH_1MCP), Reirrigado (REIR). As barras representam o intervalo de confiança em que, os contrastes que incluem o valor 1 não são significativas em $\alpha = 5\%$ ($n = 3$). O asterisco (*) indica diferença significativa.

Fonte: Do autor (2020).

3.3.2 Contraste: DH_DH1MCP

A expressão de todos os genes *ACS* analisados foi reprimida nas folhas de plantas submetidas ao déficit hídrico e pulverizadas com 1MCP (figura 21A). Quanto a expressão dos genes *ACO*, os três homólogos foram regulados positivamente, mas não houve diferença entre os tratamentos (figura 21B). Para os receptores, ambos foram induzidos pelo 1-MCP no déficit hídrico.

Embora a regulação da *ACS* seja afetada pela aplicação do 1-MCP, as *ACO* não foram responsivas aos tratamentos. Esse resultado sustenta a ideia de que a taxa limitante para produção de etileno é dependente das enzimas *ACS*, uma vez que, mesmo com diferente nível de irrigação e aplicação de composto químico não houve alteração na expressão dos genes *ACO*. É possível que essa resposta inalterada na expressão dos genes *ACO* esteja associada ao órgão (LASSERRE et al., 1996; TANG & WOODSON, 1996; TSUCHISAKA & THEOLOGIS, 2004b). A menor expressão observada nos receptores de folhas do *DH* (figura 21C) pode resultar da necessidade em elevar a sensibilidade ao etileno em períodos de seca prolonga devido a baixa disponibilidade de água do solo (JOSHI et al., 2016; KOCH et al., 2019). Então, nesse contraste a eficácia do 1-MCP em aumentar a sensibilidade ao etileno em folhas de plantas sob déficit hídrico foi reduzida. A expressão suprimida da proteína *CTR1* (*CarCTR1-like*) no déficit hídrico favoreceu o aumento na expressão do regulador dos fatores de transcrição, *CarEIL1-like*, (CHAO et al., 1997; TIEMAN et al., 2001) mas a regulação negativa do *CarERF1-like* foi inesperada (figura 21D). O *ERF1* pertence a uma superfamília de fatores de transcrição regulados por múltiplos fatores endógenos e exógenos (FUJIMOTO et al., 2000; SOLANO et al., 1998), então provavelmente esse homólogo analisado seja responsivo ao 1-MCP.

Nas raízes, os três genes homólogos da *ACS* foram positivamente regulados, mas expressão diferencial ocorreu apenas para *CarACSI-like* (figura 21E). Os homólogos da *ACO* também foram positivamente regulados e *CarACO4-like* e *CarACO5-like* foram diferencialmente expressos sob déficit hídrico (figura 21F). O gene *CarACSI-like* parece contribuir efetivamente para síntese local de ACC no déficit hídrico (*DH*) e relacionando o nível de expressão com a produção de etileno, o aumento de transcritos da *ACO4* e *ACO5* provavelmente converteu intensivamente o ACC em etileno no tratamento *DH* (figura 20). Esse é um indício de que, quanto menor o nível de hidratação do solo mais intensa é a atuação da via de biossíntese na raiz do cafeeiro e a expressão diferencial do *ACSI* pode incrementar o nível de ACC radicular. Além disso, é possível também que a retroalimentação da biossíntese

mantenha por longos períodos a produção de ACC, elevando o *pool* dessa molécula na raiz durante a ausência de chuva e irrigação.

3.3.3 Contraste: IR1MCP_DH1MCP

A pulverização do 1-MCP aumentou significativamente a expressão do gene *CaACSI-like* nas folhas de plantas irrigadas quando comparadas com as folhas pulverizadas de plantas no déficit hídrico (figura 21A). É possível que este gene seja, naturalmente, menos expresso em condição de maior restrição de água, como ocorreu no contraste *DH_DH1MCP*. Nesse sentido, provavelmente, a pulverização da calda com 1-MCP simulou uma condição de estresse hídrico localizada nas folhas de plantas bem hidratadas e essa resposta certamente está vinculada a ação do surfactante Break Thru (BTH). Como um composto de organosilicone, o BTH regula a condutância estomática reduzindo as trocas gasosas (ORBOVIC et al., 2001; LIMA, 2015; SANTOS, 2016) e isso pode ter induzido a expressão do gene *CaACSI-like* nas folhas irrigadas e pulverizadas com 1-MCP, assim como ocorreu no contraste *IR_IR1MCP*. Mas, embora o BTH tenha induzido uma situação de estresse, a antese não foi verificada em cafeeiros pulverizados na calda sem 1-MCP (LIMA, 2015; SANTOS, 2016). Essa explicação pode ser estendida para o gene *CaACS7-like*, mas de modo contrário, esse gene se mostrou responsivo ao condicionamento expresso nas plantas irrigadas+1MCP. *CaACS3-like* foi o único homólogo ACS com maior expressão no déficit hídrico e não respondendo a pulverização do 1MCP (figura 21A). Todos os homólogos da ACO foram regulados positivamente, mas não há diferença na expressão de *CaACO3-like*. Para *CaACO4-like* e *CaACO5-like* a expressão foi superior no irrigado (figura 21B). O incremento na concentração de etileno (figura 20) foliar no *IR1MCP*, provavelmente, se deve a isoformas da *ACO4* e *ACO5*. Observando o padrão de expressão do contraste *IR_IR1MCP*, é notório que o 1-MCP regulou positivamente a expressão das *ACO* nas comparações.

Quanto a via de percepção *CaETR1-like* foi reprimida no irrigado+1MCP enquanto não houve diferença na regulação positiva do *CaEIN4-like* (figura 21C). Tais resultados sugerem o 1-MCP possivelmente elevou a sensibilidade nas folhas irrigadas através da supressão da quantidade de proteínas ETR1 e mecanismos de retroalimentação parecem agir de maneira específica espacial e temporal (TRIVELLINI et al., 2011). Assim, conexões podem ser feitas com cafeeiros em condições naturais durante o florescimento: (i) o 1-MCP estimulou a biossíntese de etileno nas folhas regulando negativamente o mecanismo de *feedback* negativo ou (ii) o 1-MCP estimulou o aumento na sensibilidade ao etileno pela redução na expressão de genes receptores do ETR1. Conjuntamente, o 1-MCP pode ter atuando sobre a via de biossíntese

e sinalização através de um fino ajuste entre quantidade do hormônio e sítios de ligação para desbloqueio da via, resultando na promoção da antese. Evidentemente algumas questões importantes como tipo de órgão devem ser consideradas, mas supõe-se que o mecanismo regulatório seja conservado. Por exemplo, em gemas pode ser que o aumento ou diminuição na sensibilidade ocorra através de outro receptor. Mais recentemente foi visto que o homólogo do *CaETR1-like*, *CaETR4-like*, foi 3 vezes mais expresso poucas horas após pulverização com 1-MCP (SANTOS, 2016). O gene da proteína *CaCTR1-like* também foi regulado negativamente, uma resposta que se correlaciona positivamente com a expressão negativa observada com a *CaETR1-like*. Nesse contraste, os transdutores de sinal, *CaEIL1-like* e *CaERF1-like*, não diferiram entre os tratamentos mostrando que a comunicação para produção de respostas ao etileno é preferencialmente regulada entre a biossíntese e a percepção (figura 21D).

Nas raízes, todos os genes *ACS* foram positivamente regulados, mas não houve expressão diferencial (figura 21E), enquanto que para os genes *ACO*, *CaACO3-like* e *CaACO5-like* foram positivamente regulados e diferencialmente expressos no *IRIMCP* (figura 21F). *CaACO4-like* se mostrou estável, não diferindo entre os tratamentos. Inicialmente a regulação positiva da via de biossíntese nas raízes irrigadas parece contraditório, já que maior produção de etileno foi verificada nas raízes do *DHIMCP*. Ao observar o nível de expressão dos receptores, se confirma que a sensibilidade é, de fato, uma etapa chave no processo de síntese e emissão de respostas ao etileno. A maior expressão dos genes da *ACO* no tratamento irrigado+1MCP pode estar relacionada com vários aspectos da formação e crescimento radicular (BUER et al., 2003; CLARK et al., 1999; HAHN et al., 2008) e possivelmente um desbalanço no nível de etileno não foi constatado exatamente pelo bloqueio da via de percepção, através do controle negativo que os receptores exercem (BLEECKER, 1999; SAKAI et al., 1998).

3.3.4 Contraste: DHIMCP_REIR

Todos os membros das famílias gênicas das enzimas *ACS* (figura 21A) e *ACO* (figura 21B) analisados nesse estudo foram regulados negativamente nas folhas do déficit hídrico+1MCP. Padrão oposto foi observado para os prováveis membros da via de sinalização: *CaETR1-like*, *CaEIN4-like*, *CaCTR1-like*, *CaEIL1-like*, *CaERF1-like* foram regulados positivamente mas não houve expressão diferencial em nenhum desses genes nessa comparação (figura 21C e 21D). Curiosamente, a produção de etileno nas folhas reirrigadas se mostrou dependente da regulação da via de biossíntese. Nesse tratamento, duas horas após reidratação,

todos os genes envolvidos na síntese do ACC foram mais expressos em relação ao *DHIMCP*. Tal resultado não implica em afirmar a ineficiência do 1-MCP mas em comparação com a água, o produto exibiu menor afinidade na produção local do ACC. Correlacionando com o florescimento, a água demonstra essencialidade para além dos processos metabólicos de qualquer organismos e parece exercer um importante papel nos eventos que antecedem a antese. Ressalta-se que nas raízes do *DHIMCP*, *CaACS1-like*, *CaACS7-like*, *CaACO3-like* e *CaACO5-like* foram reprimidos em relação as raízes reirrigadas enquanto *CaACS3-like* e *CaACO4-like* não diferiram entre os tratamentos. Embora a concentração de etileno radicular das plantas reirrigadas seja significativamente menor, supostamente durante o período de seca a via de biossíntese foi superexpressada, assim como ocorreu no tratamento do déficit hídrico contínuo. Ainda que a água tenha demonstrado atuar como um importante sinal regulador da biossíntese do etileno, o tempo de 2h após a reidratação pode não ter sido suficiente retornar a níveis basais a expressão gênica.

4 CONCLUSÕES

Esse estudo reúne informações inéditas sobre a modulação positiva da produção de etileno em *Coffea arabica* promovido pelo 1-MCP. Os resultados demonstram que o 1-MCP incrementa os níveis de etileno foliar e possivelmente um mecanismo de retroalimentação pela perda do *feedback* negativo seja responsável por regular a expressão diferencial das enzimas da biossíntese. Não existe padrão para expressão dos genes *ACS* e *ACO* em resposta a pulverização de 1-MCP mas ficou evidente que a produção de etileno é modulada por ciclo de seca-reirrigação e a variação no status hídrico das plantas regula fortemente a expressão das duas principais enzimas da biossíntese do etileno. É sugerido que o ACC é translocado das raízes para parte aérea, justificando o aumento nos níveis de etileno em folhas reirrigadas. A expressão do receptor *CarETR1-like* é reprimido em resposta ao 1-MCP e o refinamento na sensibilidade pode ser o gatilho para promoção da antese em *Coffea arabica* através do 1-MCP.

REFERÊNCIAS

- Abeles, F. B., & Morgan, P. W. (1992). Front Matter. *Ethylene in Plant Biology*, iii. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-091628-6.50001-1>
- Abiri, R., Shaharuddin, N. A., Maziah, M., Yusof, Z. N. B., Atabaki, N., Sahebi, M., ... Hanafi, M. M. (2017, February 1). Role of ethylene and the APETALA 2/ethylene response factor superfamily in rice under various abiotic and biotic stress conditions. *Environmental and Experimental Botany*, Vol. 134, pp. 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.10.015>
- Adams, D. O., & Yang, S. F. (1979). Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(1), 170–174. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.1.170>
- Adams, D O, Yang, S. F., & Stumpf, P. K. (1979). *Communicated by* (Vol. 76).
- Adams, Douglas O, Shang, A., & Yang, F. A. (1977). Methionine Metabolism in Apple Tissue IMPLICATION OF S-ADENOSYLMETHIONINE AS AN INTERMEDIATE IN THE CONVERSION OF METHIONINE TO ETHYLENE'. In *Plant Physiol* (Vol. 60). Retrieved from www.plantphysiol.org
- Adams, Douglas O., & Yang, S. F. (1981). Ethylene the gaseous plant hormone: mechanism and regulation of biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. 6, pp. 161–164. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(81\)90059-1](https://doi.org/10.1016/0968-0004(81)90059-1)
- Agrônomo, E. (1997). *DAS VARIEDADES CATURRA E MUNDO NOVO DE EM DO DE PLANTAS POR COVA E DAS PLANTAS. DE BARROS.*
- Albacete, A. A., Martínez-Andújar, C., & Pérez-Alfocea, F. (2014, January). Hormonal and metabolic regulation of source-sink relations under salinity and drought: From plant survival to crop yield stability. *Biotechnology Advances*, Vol. 32, pp. 12–30. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.10.005>
- Alonso, J. M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S., & Ecker, J. R. (1999). EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. *Science*, 284(5423), 2148–2152. <https://doi.org/10.1126/science.284.5423.2148>
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Solano, R., Wisman, E., Ferrari, S., Ausubel, F. M., & Ecker, J. R. (2003). Five components of the ethylene-response pathway identified in a screen for weak ethylene-insensitive mutants in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), 2992–2997. <https://doi.org/10.1073/pnas.0438070100>
- An, F., Zhao, Q., Ji, Y., Li, W., Jiang, Z., Yu, X., ... Guo, H. (2010). Ethylene-induced stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 is mediated by proteasomal degradation of EIN3 binding F-box 1 and 2 that requires EIN2 in arabidopsis. *Plant Cell*, 22(7), 2384–2401. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.076588>
- Andersson, J. O., & Andersson, S. G. E. (2001). Pseudogenes, Junk DNA, and the Dynamics of Rickettsia Genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 18(5), 829–839. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003864>
- Argueso, C. T., Hansen, M., & Kieber, J. J. (2007, June). Regulation of ethylene biosynthesis.

Journal of Plant Growth Regulation, Vol. 26, pp. 92–105. <https://doi.org/10.1007/s00344-007-0013-5>

Arraes, F. B. M., Beneventi, M. A., Lisei de Sa, M. E., Paixao, J. F. R., Albuquerque, E. V. S., Marin, S. R. R., ... Grossi-de-Sa, M. F. (2015). Implications of ethylene biosynthesis and signaling in soybean drought stress tolerance. *BMC Plant Biology*, 15(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0597-z>

Augusto, B., & Silva, O. (n.d.). *The biannuality of coffee culture and the economic result of storage Article in Custos e Agronegocio · July 2013 CITATIONS 0 READS 68*. Retrieved from www.custoseagronegocioonline.com.br

Balakirev, E. S., & Ayala, F. J. (2003). Pseudogenes: Are They “Junk” or Functional DNA? *Annual Review of Genetics*, 37(1), 123–151. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.040103.103949>

Barbosa, D., Mandioca, E., Barbosa, D. S. G., Ltda, B., Belan, L. L., Carvalho, E. G., ... Testemunha, M. (n.d.). *Efeito do mathury na uniformidade de maturação do cafeeiro em lavouras de cafeicultura de montanha. d.*

Barbosa Monteiro Arraes, F., Aparecida Beneventi, M., Eugenia Lisei de Sa, M., Felipe Roca Paixao, J., Valeria Saliba Albuquerque, E., Regina Rockenbach Marin, S., ... Fatima Grossi-de-Sa, M. (2015). *Implications of ethylene biosynthesis and signaling in soybean drought stress tolerance*. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0597-z>

Barry, C. S., Blume, B., Bouzayen, M., Cooper, W., Hamilton, A. J., & Grierson, D. (1996). Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. *The Plant Journal*, 9(4), 525–535. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.09040525.x>

Barry, C. S., & Giovannoni, J. J. (2006). Ripening in the tomato Green-ripe mutant is inhibited by ectopic expression of a protein that disrupts ethylene signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(20), 7923–7928. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602319103>

Basu, S., Ramegowda, V., Kumar, A., & Pereira, A. (2016). Plant adaptation to drought stress [version 1; referees: 3 approved]. *F1000Research*, Vol. 5. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.7678.1>

Beltrano, Ronco, & Montaldi. (1999). Drought Stress Syndrome in Wheat Is Provoked by Ethylene Evolution Imbalance and Reversed by Rewatering, Aminoethoxyvinylglycine, or Sodium Benzoate. *Journal of Plant Growth Regulation*, 18(2), 59–64. <https://doi.org/10.1007/pl00007049>

Bidonde, S., Ferrer, M. A., Zegzouti, H., Ramassamy, S., Latche, A., Pech, J.-C., ... Bouzayen, M. (1998). Expression and characterization of three tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase cDNAs in yeast. *European Journal of Biochemistry*, 253(1), 20–26. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2530020.x>

Binnie, J. E., & McManus, M. T. (2009). Characterization of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) oxidase multigene family of *Malus domestica* Borkh. *Phytochemistry*, 70(3), 348–360. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.01.002>

Blankenship, S. M., & Dole, J. M. (2003, April 1). 1-Methylcyclopropene: A review. *Postharvest Biology and Technology*, Vol. 28, pp. 1–25. <https://doi.org/10.1016/S0925->

5214(02)00246-6

Bleecker, A. B. (1999, July 1). Ethylene perception and signaling: An evolutionary perspective. *Trends in Plant Science*, Vol. 4, pp. 269–274. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(99\)01427-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01427-2)

Bleecker, A. B., Esch, J. J., Hall, A. E., Rodríguez, F. I., & Binder, B. M. (1998). The ethylene-receptor family from Arabidopsis: Structure and function. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 353(1374), 1405–1412. <https://doi.org/10.1098/rstb.1998.0295>

Bleecker, A. B., & Kende, H. (2000a). Ethylene: A Gaseous Signal Molecule in Plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16(1), 1–18. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.1>

Bleecker, A. B., & Kende, H. (2000b). ETHYLENE: A Gaseous Signal Molecule in Plants. In *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* (Vol. 16). Retrieved from www.annualreviews.org

Boller, T., Herner, R. C., & Kende, H. (1979). Assay for and Enzymatic Formation of an Ethylene Precursor, 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid*. In *Planta* (Vol. 145).

Bouzayen, M., Latché, A., & Pech, J. C. (1990). Subcellular localization of the sites of conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid into ethylene in plant cells. *Planta*, 180(2), 175–180. <https://doi.org/10.1007/BF00193992>

Bradford, K. J., & Trewavas, A. J. (1994). Sensitivity thresholds and variable time scales in plant hormone action. *Plant Physiology*, 105(4), 1029–1036. <https://doi.org/10.1104/pp.105.4.1029>

Bradford, Kent J. (2008). Shang Fa Yang: Pioneer in plant ethylene biochemistry. *Plant Science*, 175(1–2), 2–7. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.01.005>

Bradford, Kent J., & Yang, S. F. (1980). Xylem Transport of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid, an Ethylene Precursor, in Waterlogged Tomato Plants. *Plant Physiology*, 65(2), 322–326. <https://doi.org/10.1104/pp.65.2.322>

Brisson, L., El Bakkali-Taheri, N., Giorgi, M., Fadel, A., Kaizer, J., Réglie, M., ... Simaan, A. J. (2012). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase: Insight into cofactor binding from experimental and theoretical studies. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 17(6), 939–949. <https://doi.org/10.1007/s00775-012-0910-3>

Buer, C. S., Wasteneys, G. O., & Masle, J. (2003). Ethylene modulates root-wave responses in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 132(2), 1085–1096. <https://doi.org/10.1104/pp.102.019182>

Burns, J. K. (2008). 1-Methylcyclopropene applications in preharvest systems: Focus on citrus. *HortScience*, 43(1), 112–114. <https://doi.org/10.21273/hortsci.43.1.112>

Bürstenbinder, K., Waduware, I., Schoor, S., Moffatt, B. A., Wirtz, M., Minocha, S. C., ... Sauter, M. (2010). Inhibition of 5'-methylthioadenosine metabolism in the Yang cycle alters polyamine levels, and impairs seedling growth and reproduction in Arabidopsis. *The Plant Journal*, no-no. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04211.x>

Cai, C., Chen, K. S., Xu, W. P., Zhang, W. S., Li, X., & Ferguson, I. (2006). Effect of 1-MCP on postharvest quality of loquat fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 40(2), 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.12.014>

Campa, C., Ballester, J. F., Doubeau, S., Dussert, S., Hamon, S., & Noirot, M. (2004).

Trigonelline and sucrose diversity in wild *Coffea* species. *Food Chemistry*, 88(1), 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.020>

Cao, Y.-R., Chen, S.-Y., & Zhang, J.-S. (2008). Plant Signaling & Behavior Ethylene signaling regulates salt stress response. *Plant Signaling & Behavior*, 3(10), 761–763. <https://doi.org/10.4161/psb.3.10.5934>

Çelikel, F. G., Dodge, L. L., & Reid, M. S. (2002). Efficacy of 1-MCP (1-methylcyclopropene) and Promalin for extending the post-harvest life of Oriental lilies (*Lilium* × “Mona Lisa” and ‘Stargazer’). *Scientia Horticulturae*, 93(2), 149–155. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(01\)00331-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(01)00331-4)

Chae, H. S., Faure, F., & Kieber, J. J. (2003). The *eto1*, *eto2*, and *eto3* mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in *Arabidopsis* by increasing the stability of ACS protein. *Plant Cell*, 15(2), 545–559. <https://doi.org/10.1105/tpc.006882>

Chalfun Júnior, A., & Horllys Gomes Barreto Coorientador, O. (n.d.). *CARLOS HENRIQUE CARDON IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO FLOWERING LOCUS T (FT) E SUA EXPRESSÃO GÊNICA EM DIFERENTES ESPÉCIES DO GÊNERO COFFEA*.

Chang, C. (2016a). Q&A: How do plants respond to ethylene and what is its importance? *BMC Biology*, 14(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0230-0>

Chang, C. (2016b). Q and A: How do plants respond to ethylene and what is its importance? *BMC Biology*, 14(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0230-0>

Chang, C., & Bleeker, A. B. (2004). Ethylene biology. More than a gas. *Plant Physiology*, 136(2), 2895–2899. <https://doi.org/10.1104/pp.104.900122>

Chang, C., Kwok, S. F., Bleeker, A. B., & Meyerowitz, E. M. (1993). *Arabidopsis* ethylene-response gene *ETR1*: Similarity of product to two-component regulators. *Science*, 262(5133), 539–544. <https://doi.org/10.1126/science.8211181>

Chang, C., & Stadler, R. (2001). Ethylene hormone receptor action in *Arabidopsis*. *BioEssays*, 23(7), 619–627. <https://doi.org/10.1002/bies.1087>

Chao, Q., Rothenberg, M., Solano, R., Roman, G., Terzaghi, W., & Ecker, J. R. (1997). Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell*, 89(7), 1133–1144. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80300-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80300-1)

Chen, H., Sun, J., Li, S., Cui, Q., Zhang, H., Xin, F., ... Huang, S. (2016). An ACC Oxidase Gene Essential for Cucumber Carpel Development. *Molecular Plant*, 9(9), 1315–1327. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.06.018>

Chen, T., Xu, Y., Wang, J., Wang, Z., Yang, J., & Zhang, J. (2013). Polyamines and ethylene interact in rice grains in response to soil droughting during grain filling. *Journal of Experimental Botany*, 64(8), 2523–2538. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert115>

Chen, W., Yin, X., Wang, L., Tian, J., Yang, R., Liu, D., ... Gao, J. (2013). Involvement of rose aquaporin *RhPIP1;1* in ethylene-regulated petal expansion through interaction with *RhPIP2;1*. *Plant Molecular Biology*, 83(3), 219–233. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0084-6>

Cin, V. D., Rizzini, F. M., Botton, A., & Tonutti, P. (2006). *The ethylene biosynthetic and signal transduction pathways are differently affected by 1-MCP in apple and peach fruit*. 42,

125–133. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.06.008>

Clark, D. G., Gubrium, E. K., Barrett, J. E., Nell, T. A., & Klee, H. J. (1999). Root formation in ethylene-insensitive plants. *Plant Physiology*, *121*(1), 53–59. <https://doi.org/10.1104/pp.121.1.53>

Clifton, I. J., McDonough, M. A., Ehrismann, D., Kershaw, N. J., Granatino, N., & Schofield, C. J. (2006, April). Structural studies on 2-oxoglutarate oxygenases and related double-stranded β -helix fold proteins. *Journal of Inorganic Biochemistry*, Vol. 100, pp. 644–669. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.01.024>

Clouse, R. M., & Carraro, N. (2014). A novel phylogeny and morphological reconstruction of the PIN genes and first phylogeny of the ACC-oxidases (ACOs). *Frontiers in Plant Science*, *5*(JUN). <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00296>

Conti, V., Mareri, L., Faleri, C., Nepi, M., Romi, M., Cai, G., & Cantini, C. (2019). Drought stress affects the response of italian local tomato (*solanum lycopersicum* L.) varieties in a genotype-dependent manner. *Plants*, *8*(9). <https://doi.org/10.3390/plants8090336>

Crisosto, C. H., Grantz, D. A., & Meinzer, F. C. (1992). Effects of water deficit on flower opening in coffee (*Coffea arabica* L.). *Tree Physiology*, *10*(2), 127–139. <https://doi.org/10.1093/treephys/10.2.127>

DaMatta, F. M., Cunha, R. L., Antunes, W. C., Martins, S. C. V., Araujo, W. L., Fernie, A. R., & Moraes, G. A. B. K. (2008). In field-grown coffee trees source–sink manipulation alters photosynthetic rates, independently of carbon metabolism, via alterations in stomatal function. *New Phytologist*, *178*(2), 348–357. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02367.x>

Dawood, T., Yang, X., Visser, E. J. W., Te Beek, T. A. H., Kensche, P. R., Cristescu, S. M., ... Rieu, I. (2016). A co-opted hormonal cascade activates dormant adventitious root primordia upon flooding in *solanum dulcamara*. *Plant Physiology*, *170*(4), 2351–2364. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00773>

De Camargo, Â. P., & De Camargo, M. B. P. (2001). Definição e Esquematização das Fases Fenológicas do Cafeeiro Arábica nas Condições Tropicais do Brasil. *Bragantia*, *60*(1), 65–68.

De Oliveira, E., Da Silva, F. M., Salvador, N., De Souza, Z. M., Chalfoun, S. M., & De Figueiredo, C. A. P. (2007). Custos operacionais da colheita mecanizada do cafeeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, *42*(6), 827–831. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2007000600009>

de Oliveira, R. R., Cesarino, I., Mazzafera, P., & Dornelas, M. C. (2014). Flower development in *Coffea arabica* L.: New insights into MADS-box genes. *Plant Reproduction*, *27*(2), 79–94. <https://doi.org/10.1007/s00497-014-0242-2>

Deikman, J. (1997). Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene transcription. *Physiologia Plantarum*, *100*(3), 561–566. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb03061.x>

Demirevska, K., Zasheva, D., Dimitrov, R., Simova-Stoilova, L., Stamenova, M., & Feller, U. (2009). Drought stress effects on Rubisco in wheat: Changes in the Rubisco large subunit. *Acta Physiologiae Plantarum*, *31*(6), 1129–1138. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0331-2>

Depaepe, T., & Van Der Straeten, D. (2019). Tools of the Ethylene Trade: A Chemical Kit to Influence Ethylene Responses in Plants and Its Use in Agriculture. *Small Methods*, 1900267.

<https://doi.org/10.1002/smt.201900267>

Depuydt, S., & Hardtke, C. S. (2011, May 10). Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Current Biology*, Vol. 21. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.03.013>

Dilley, D. R., Wang, Z., Kadirjan-Kalbach, D. K., Ververidis, F., Beaudrought, R., & Padmanabhan, K. (2013). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase reaction mechanism and putative post-translational activities of the ACCO protein. *AoB PLANTS*, 5. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plt031>

Ditta, G., Pinyopich, A., Robles, P., Pelaz, S., & Yanofsky, M. F. (2004). The SEP4 gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity. *Current Biology*, 14(21), 1935–1940. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.10.028>

Du, H., Wu, N., Cui, F., You, L., Li, X., & Xiong, L. (2014). A homolog of <sc>ETHYLENE OVERPRODUCER</sc>, <sc>O</sc> s <sc>ETOL</sc> 1, differentially modulates drought and submergence tolerance in rice. *The Plant Journal*, 78(5), 834–849. <https://doi.org/10.1111/tpj.12508>

Dubois, M., Van den Broeck, L., & Inzé, D. (2018, April 1). The Pivotal Role of Ethylene in Plant Growth. *Trends in Plant Science*, Vol. 23, pp. 311–323. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.01.003>

Dubouzet, J. G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E. G., Miura, S., ... Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant Journal*, 33(4), 751–763. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01661.x>

Dugardeyn, J., Vandenbussche, F., & Van Der Straeten, D. (2007). To grow or not to grow: what can we learn on ethylene-gibberellin cross-talk by in silico gene expression analysis? *Journal of Experimental Botany*, 59(1), 1–16. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm349>

El-Sharkawy, I., Kim, W. S., Jayasankar, S., Svircev, A. M., & Brown, D. C. W. (2008). Differential regulation of four members of the ACC synthase gene family in plum. *Journal of Experimental Botany*, 59(8), 2009–2027. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern056>

Elias, R., & Almeida, B. (2013). *Influência Do Uso Do Inibidor De Café Lavras - Mg.*

Ella, L., Zion, A., Nehemia, A., & Amnon, L. (2003). Effect of the ethylene action inhibitor 1-methylcyclopropene on parsley leaf senescence and ethylene biosynthesis. *Postharvest Biology and Technology*, 30(1), 67–74. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(03\)00080-2](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(03)00080-2)

English, P. J., Lycett, G. W., Roberts, J. A., & Jackson, M. B. (1995). Increased 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase activity in shoots of flooded tomato plants raises ethylene production to physiologically active levels. *Plant Physiology*, 109(4), 1435–1440. <https://doi.org/10.1104/pp.109.4.1435>

Eum, H. L., Kim, H. B., Choi, S. B., & Lee, S. K. (2009). Regulation of ethylene biosynthesis by nitric oxide in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit harvested at different ripening stages. *European Food Research and Technology*, 228(3), 331–338. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0938-3>

Fa Yang, S., & Hoffman, N. E. (1984). *ETHYLENE BIOSYNTHESIS AND ITS REGULATION IN HIGHER PLANTS*. Retrieved from www.annualreviews.org

Farrow, S. C., & Facchini, P. J. (2014, October 9). Functional diversity of 2-

oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenases in plant metabolism. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00524>

Felipe Alves Moreira Luiz Carlos Trugo, R., & Alberto Bastos De Maria, C. (2000). *COMPONENTES VOLÁTEIS DO CAFÉ TORRADO. PARTE II. COMPOSTOS ALIFÁTICOS, ALICÍCLICOS E AROMÁTICOS* (Vol. 23).

Feng, X., Apelbaum, A., Sisler, E. C., & Goren, R. (2004). Control of ethylene activity in various plant systems by structural analogues of 1-methylcyclopropene. *Plant Growth Regulation*, 42(1), 29–38. <https://doi.org/10.1023/B:GROW.0000014900.12351.4e>

Feng, Y., Xu, P., Li, B., Li, P., Wen, X., An, F., ... Guo, H. (2017). Ethylene promotes root hair growth through coordinated EIN3/EIL1 and RHD6/RSL1 activity in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(52), 13834–13839. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711723115>

Fernandes-Brum, C. N., Garcia, B. de O., Moreira, R. O., Ságio, S. A., Barreto, H. G., Lima, A. A., ... Chalfun-Júnior, A. (2017). A panel of the most suitable reference genes for RT-qPCR expression studies of coffee: screening their stability under different conditions. *Tree Genetics and Genomes*, 13(6), 131. <https://doi.org/10.1007/s11295-017-1213-1>

Ferreira De Mendonça, R., Rodrigues, W. N., Deleon Martins, L., & Tomaz, M. A. (n.d.). *ABORDAGEM SOBRE A BIENALIDADE DE PRODUÇÃO EM PLANTAS DE CAFÉ*.

Force, A., Lynch, M., Pickett, B., Amores, A., Yan, Y.-L., & Postlethwait, J. (1999). *Preservation of Duplicate Genes by Complementary, Degenerative Mutations*.

Forni, C., Duca, D., & Glick, B. R. (2017). Mechanisms of plant response to salt and drought stress and their alteration by rhizobacteria. *Plant and Soil*, 410(1–2), 335–356. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3007-x>

Franca, A. S., Mendonça, J. C. F., & Oliveira, S. D. (2005). Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. *LWT - Food Science and Technology*, 38(7), 709–715. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.08.014>

Franck, N., Vaast, P., Genard, M., & Dauzat, J. (2006). Soluble sugars mediate sink feedback down-regulation of leaf photosynthesis in field-grown *Coffea arabica*. *Tree Physiology*, 26(4), 517–525. <https://doi.org/10.1093/treephys/26.4.517>

Fujimoto, S. Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H., & Ohme-Takagi, M. (2000). Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell*, 12(3), 393–404. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.3.393>

Galati, V. C., Muniz, A. C. C., Guimarães, J. E. R., Inestroza-Lizardo, C. O., Mattiuz, C. M. F., & Mattiuz, B. H. (2017). Conservação pós-colheita de alstroémeria ‘ajax’ com uso de 1-metilciclopropeno. *Ciencia e Agrotecnologia*, 41(2), 181–190. <https://doi.org/10.1590/1413-70542017412032816>

Gallie, D. R., & Young, T. E. (2004). The ethylene biosynthetic and perception machinery is differentially expressed during endosperm and embryo development in maize. *Molecular Genetics and Genomics*, 271(3), 267–281. <https://doi.org/10.1007/s00438-004-0977-9>

Gao, Z., Chen, Y.-F., Randlett, M. D., Zhao, X.-C., Findell, J. L., Kieber, J. J., & Schaller, G. E. (2003). *Localization of the Raf-like Kinase CTR1 to the Endoplasmic Reticulum of Arabidopsis through Participation in Ethylene Receptor Signaling Complexes**.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M305548200>

- Gehl, C., Jowkar, M. M., Wagenhaus, J., & Serek, M. (2019). Application of 1-MCP as a liquid formulation prevents ethylene-induced senescence in *Phalaenopsis* orchid flowers and *Kalanchoë blossfeldiana* inflorescences. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *94*(4), 499–506. <https://doi.org/10.1080/14620316.2018.1563510>
- Geisler-Lee, J., Caldwell, C., & Gallie, D. R. (2010). Expression of the ethylene biosynthetic machinery in maize roots is regulated in response to hypoxia. *Journal of Experimental Botany*, *61*(3), 857–871. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp362>
- Gertman, E., & Fuchs, Y. (1972). Effect of Abscisic Acid and Its Interactions with Other Plant Hormones on Ethylene Production in Two Plant Systems. *Plant Physiology*, *50*(1), 194–195. <https://doi.org/10.1104/pp.50.1.194>
- Golding, J. B., Shearer, D., Wyllie, S. G., & McGlasson, W. B. (1998). Application of 1-MCP and propylene to identify ethylene-dependent ripening processes in mature banana fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *14*(1), 87–98. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(98\)00032-5](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(98)00032-5)
- Gómez-Cadenas, A., Tadeo, F. R., Talon, M., & Primo-Millo, E. (1996). Leaf abscission induced by ethylene in water-stressed intact seedlings of Cleopatra mandarin requires previous abscisic acid accumulation in roots. *Plant Physiology*, *112*(1), 401–408. <https://doi.org/10.1104/pp.112.1.401>
- Gómez-Lim, M. A., Valdés-López, V., Cruz-Hernandez, A., & Saucedo-Arias, L. J. (1993). Isolation and characterization of a gene involved in ethylene biosynthesis from *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, *134*(2), 217–221. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90096-L](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90096-L)
- Gouveia, N. M. (1984). *Estudo da diferenciação de crescimento de gemas florais de coffea arabica L.: Observações sobre antese e maturação dos frutos* (p. 237). p. 237.
- Graham, L. E., Schippers, J. H. M., Dijkwel, P. P., & Wagstaff, C. (2018). Ethylene and Senescence Processes. In *Annual Plant Reviews online* (pp. 305–341). <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0484>
- Gray, W. M. (2004, September). Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biology*, Vol. 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020311>
- Grbic, V., & Bleecker, A. B. (1995). Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *8*(4), 595–602. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1995.8040595.x>
- Guan, R., Zhao, Y., Zhang, H., Fan, G., Liu, X., Zhou, W., ... Chen, W. (2016). Draft genome of the living fossil *Ginkgo biloba*. *GigaScience*, *5*(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s13742-016-0154-1>
- Guerra, A., Rocha, O., Rodrigues, G., Sanzonowicz, C., Sampaio, J., Silva, H., & Araújo, M. (2005). *Irrigação do cafeeiro no cerrado: estratégia de manejo de água para uniformização de florada*.
- Guillén, F., Castillo, S., Zapata, P. J., Martínez-Romero, D., Serrano, M., & Valero, D. (2007). Efficacy of 1-MCP treatment in tomato fruit. 1. Duration and concentration of 1-MCP treatment to gain an effective delay of postharvest ripening. *Postharvest Biology and Technology*, *43*(1), 23–27. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.07.004>

Guo, H., & Ecker, J. R. (2004). The ethylene signaling pathway: New insights. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol. 7, pp. 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2003.11.011>

Ha, S. T. T., Lim, J. H., & In, B. C. (2019). Simultaneous Inhibition of Ethylene Biosynthesis and Binding Using AVG and 1-MCP in Two Rose Cultivars with Different Sensitivities to Ethylene. *Journal of Plant Growth Regulation*. <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09999-6>

Habben, J. E., Bao, X., Bate, N. J., DeBruin, J. L., Dolan, D., Hasegawa, D., ... Schussler, J. R. (2014). Transgenic alteration of ethylene biosynthesis increases grain yield in maize under field drought-stress conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 12(6), 685–693. <https://doi.org/10.1111/pbi.12172>

Hahn, A., Zimmermann, R., Wanke, D., Harter, K., & Edelmann, H. G. (2008). The root cap determines ethylene-dependent growth and development in maize roots. *Molecular Plant*, 1(2), 359–367. <https://doi.org/10.1093/mp/ssm027>

Hall, A. E., Findell, J. L., Schaller, G. E., Sisler, E. C., & Bleecker, A. B. (2000). *Ethylene Perception by the ERS1 Protein in Arabidopsis I*. Retrieved from www.plantphysiol.org

Hall, B. P., Shakeel, S. N., & Schaller, G. E. (2007, June). Ethylene receptors: Ethylene perception and signal transduction. *Journal of Plant Growth Regulation*, Vol. 26, pp. 118–130. <https://doi.org/10.1007/s00344-007-9000-0>

Hamilton, A. J., Lycett, G. W., & Grierson, D. (1990). Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature*, 346(6281), 284–287. <https://doi.org/10.1038/346284a0>

Hartman, S., Sasidharan, R., & Voesenek, L. A. C. J. (2020). The role of ethylene in metabolic acclimations to low oxygen. *New Phytologist*, nph.16378. <https://doi.org/10.1111/nph.16378>

Hausinger, R. P. (2004, January). Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 39, pp. 21–68. <https://doi.org/10.1080/10409230490440541>

He, C., Thomas, A. M., Galimova, G. R., Mebel, A. M., & Kaiser, R. I. (2019). Gas-Phase Formation of 1-Methylcyclopropene and 3-Methylcyclopropene via the Reaction of the Methylidyne Radical (CH; X2II) with Propylene (CH₃CHCH₂; X1A'). *Journal of Physical Chemistry A*. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.9b09815>

Hegg, E. L., & Jr, L. Q. (1997). The 2-His-1-Carboxylate Facial Triad - An Emerging Structural Motif in Mononuclear Non-Heme Iron(II) Enzymes. *European Journal of Biochemistry*, 250(3), 625–629. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00625.x>

Hou, J. Y., Lin, W. L., Lee, N., & Alex Chang, Y. C. (2012). The residual effect of 1-methylcyclopropene on protecting phalaenopsis flowers against ethylene injury. *HortScience*, 47(10), 1484–1489. <https://doi.org/10.21273/hortsci.47.10.1484>

Houben, M., & Van de Poel, B. (2019, May 31). 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (ACO): The enzyme that makes the plant hormone ethylene. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00695>

Hu, Z., Huang, X., Amombo, E., Liu, A., Fan, J., Bi, A., ... Fu, J. (2020). The ethylene responsive factor CdERF1 from bermudagrass (*Cynodon dactylon*) positively regulates cold tolerance. *Plant Science*, 294, 110432. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110432>

- Hua, J., & Meyerowitz, E. M. (1998). Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, *94*(2), 261–271. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81425-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81425-7)
- Huang, P. Y., Catinot, J., & Zimmerli, L. (2016). Ethylene response factors in *Arabidopsis* immunity. *Journal of Experimental Botany*, *67*(5), 1231–1241. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv518>
- Huang, Y., Li, H., Hutchison, C. E., Laskey, J., & Kieber, J. J. (2003). Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *33*(2), 221–233. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01620.x>
- Hyun, S. C., & Kieber, J. J. (2005, June). Eto Brute? Role of ACS turnover in regulating ethylene biosynthesis. *Trends in Plant Science*, Vol. 10, pp. 291–296. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.04.006>
- Inaba, A., Liu, X., Yokotani, N., Yamane, M., Lu, W. J., Nakano, R., & Kubo, Y. (2007). Differential feedback regulation of ethylene biosynthesis in pulp and peel tissues of banana fruit. *Journal of Experimental Botany*, *58*(5), 1047–1057. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl265>
- Iwai, T., Miyasaka, A., Seo, S., & Ohashi, Y. (2006). Contribution of ethylene biosynthesis for resistance to blast fungus infection in young rice plants. *Plant Physiology*, *142*(3), 1202–1215. <https://doi.org/10.1104/pp.106.085258>
- Jacq, C., Miller, J. R., & Brownlee, G. G. (1977). A pseudogene structure in 5S DNA of *Xenopus laevis*. *Cell*, *12*(1), 109–120. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90189-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90189-1)
- Jeong, J., Huber, D. J., & Sargent, S. A. (2002). Influence of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on ripening and cell-wall matrix polysaccharides of avocado (*Persea americana*) fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *25*(3), 241–256. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(01\)00184-3](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00184-3)
- John, P. (1997). Ethylene biosynthesis: The role of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase, and its possible evolutionary origin. *Physiologia Plantarum*, *100*(3), 583–592. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb03064.x>
- John, P., Jr., A., Miller, P., & Miller, A. J. (1985). Activity of the Ethylene-forming Enzyme Measured in vivo at Different Cell potentials. *Journal of Plant Physiology*, *121*(5), 397–406. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(85\)80076-6](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(85)80076-6)
- Joo, S., Liu, Y., Lueth, A., & Zhang, S. (2008). MAPK phosphorylation-induced stabilization of ACS6 protein is mediated by the non-catalytic C-terminal domain, which also contains the cis-determinant for rapid degradation by the 26S proteasome pathway. *The Plant Journal*, *54*(1), 129–140. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03404.x>
- Joshi, R., Wani, S. H., Singh, B., Bohra, A., Dar, Z. A., Lone, A. A., ... Singla-Pareek, S. L. (2016). Transcription factors and plants response to drought stress: Current understanding and future directions. *Frontiers in Plant Science*, *7*(2016JULY). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01029>
- Ju, C., Yoon, G. M., Shemansky, J. M., Lin, D. Y., Ying, Z. I., Chang, J., ... Chang, C. (2012). CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(47), 19486–19491.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1214848109>

Kaul, S., Koo, H. L., Jenkins, J., Rizzo, M., Rooney, T., Tallon, L. J., ... Somerville, C. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, *408*(6814), 796–815. <https://doi.org/10.1038/35048692>

Kawai, Y., Ono, E., & Mizutani, M. (2014). Evolution and diversity of the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase superfamily in plants. *The Plant Journal*, *78*(2), 328–343. <https://doi.org/10.1111/tpj.12479>

Kebenei, Z., Sisler, E. C., Winkelmann, T., & Serek, M. (2003). Efficacy of new inhibitors of ethylene perception in improvement of display life of kalanchoë (*Kalanchoë blossfeldiana* Poelln.) flowers. *Postharvest Biology and Technology*, *30*(2), 169–176. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(03\)00107-8](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(03)00107-8)

Kevany, B. M., Tieman, D. M., Taylor, M. G., Cin, V. D., & Klee, H. J. (2007). Ethylene receptor degradation controls the timing of ripening in tomato fruit. *The Plant Journal*, *51*(3), 458–467. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03170.x>

Kieber, J. J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K. A., & Ecker, J. R. (1993). CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell*, *72*(3), 427–441. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90119-B](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90119-B)

Klee, H., & Tieman, D. (2002). The tomato ethylene receptor gene family: Form and function. *Physiologia Plantarum*, Vol. 115, pp. 336–341. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1150302.x>

Koch, G., Rolland, G., Dausat, M., Bédiée, A., Baldazzi, V., Bertin, N., ... Granier, C. (2019). Leaf production and expansion: A generalized response to drought stresses from cells to whole leaf biomass—a case study in the tomato compound leaf. *Plants*, *8*(10). <https://doi.org/10.3390/plants8100409>

Kohli, A., Sreenivasulu, N., Lakshmanan, P., & Kumar, P. P. (2013). The phytohormone crosstalk paradigm takes center stage in understanding how plants respond to abiotic stresses. *Plant Cell Reports*, *32*(7), 945–957. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1461-y>

Kuroha, T., Nagai, K., Gamuyao, R., Wang, D. R., Furuta, T., Nakamori, M., ... Ashikari, M. (2018). Ethylene-gibberellin signaling underlies adaptation of rice to periodic flooding. *Science*, *361*(6398), 181–186. <https://doi.org/10.1126/science.aat1577>

L-C Wang, K., Li, H., & Ecker, J. R. (2002). *Ethylene Biosynthesis and Signaling Networks*. <https://doi.org/10.1105/tpc.001768>

Lacey, R. F., & Binder, B. M. (2014a). How plants sense ethylene gas - The ethylene receptors. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *133*, 58–62. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.01.006>

Lacey, R. F., & Binder, B. M. (2014b). How plants sense ethylene gas - The ethylene receptors. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *133*, 58–62. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.01.006>

Larrainzar, E., Molenaar, J. A., Wienkoop, S., Gil-Quintana, E., Alibert, B., Limami, A. M., ... González, E. M. (2014). Drought stress provokes the down-regulation of methionine and ethylene biosynthesis pathways in *Medicago truncatula* roots and nodules. *Plant, Cell and Environment*, *37*(9), 2051–2063. <https://doi.org/10.1111/pce.12285>

- Lasserre, E., Bouquin, T., Hernandez, J. A., Pech, J.-C., Balagué, C., & Bull, J. (1996). Structure and expression of three genes encoding ACC oxidase homologs from melon (*Cucumis melo* L.). *MGG Molecular & General Genetics*, *251*(1), 81–90. <https://doi.org/10.1007/bf02174348>
- Lee, H. Y., Chen, Y.-C., Kieber, J. J., & Yoon, G. M. (2017). Regulation of the turnover of ACC synthases by phytohormones and heterodimerization in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *91*(3), 491–504. <https://doi.org/10.1111/tpj.13585>
- Lee, H. Y., & Yoon, G. M. (2018). Regulation of ethylene biosynthesis by phytohormones in etiolated rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Molecules and Cells*, *41*(4), 311–319. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.2224>
- Leite, E. J., Marcelo, M., Paes De Camargo José, B., Macedo, R., Roberto, P., Thomaziello, A., ... Ferreira, A. (2004). *Fenologia do Cafeeiro: Condições Agrometeorológicas e Balanço Hídrico do Ano Agrícola Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Café Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*. Retrieved from www.embrapa.br/cafe
- Lestari, R., Rio, M., Martin, F., Leclercq, J., Woraathasin, N., Roques, S., ... Montoro, P. (2018). Overexpression of *Hevea brasiliensis* ethylene response factor *HbERF-IXc5* enhances growth and tolerance to abiotic stress and affects laticifer differentiation. *Plant Biotechnology Journal*, *16*(1), 322–336. <https://doi.org/10.1111/pbi.12774>
- Li, Y., Zhu, B., Xu, W., Zhu, H., Chen, A., Xie, Y., ... Luo, Y. (2007). LeERF1 positively modulated ethylene triple response on etiolated seedling, plant development and fruit ripening and softening in tomato. *Plant Cell Reports*, *26*(11), 1999–2008. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0394-8>
- Liang, X., Abel, S., Keller, J. A., Shen, N. F., & Theologian, A. (1992). *The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of Arabidopsis thaliana (ethylene biosynthesis/gene regulation/auxin/cycloheximide/gene evolution)* (Vol. 89).
- Lieberman, M., Kunishi, A., Mapson, L., & Wardale, D. (1965). Ethylene production from methionine. *Biochemical Journal*, *97*(2), 449–459. <https://doi.org/10.1042/bj0970449>
- Lieberman, Morris, Kunishi, A., Mapson, L. W., & Wardale, D. A. (1966). Stimulation of Ethylene Production in Apple Tissue Slices by Methionine. *Plant Physiology*, *41*(3), 376–382. <https://doi.org/10.1104/pp.41.3.376>
- LIMA, A. A. (2015). Ethylene regulation under different watering conditions and its possible involvement in coffee (*Coffea arabica* L.) flowering. *Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras*, 151.
- Lima, A., Ságio, S., Chalfun-Júnior, A., & Paiva, L. (2011). In silico characterization of putative members of the coffee (*Coffea arabica*) ethylene signaling pathway. *Genetics and Molecular Research*, *10*(2), 1277–1289. <https://doi.org/10.4238/vol10-2gmr1314>
- Lin, Z., Zhong, S., & Grierson, D. (2009). Recent advances in ethylene research. *Journal of Experimental Botany*, *60*(12), 3311–3336. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp204>
- Linkies, A., Müller, K., Morris, K., Turečková, V., Wenk, M., Cadman, C. S. C., ... Leubner-Metzger, G. (2009). Ethylene interacts with abscisic acid to regulate endosperm rupture during germination: A comparative approach using *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, *21*(12), 3803–3822. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.070201>
- Liu, D., Liu, X., Meng, Y., Sun, C., Tang, H., Jiang, Y., ... Gao, J. (2013). An organ-specific

- role for ethylene in rose petal expansion during dehydration and rehydration. *Journal of Experimental Botany*, 64(8), 2333–2344. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert092>
- Liu, M., Diretto, G., Pirrello, J., Roustan, J. P., Li, Z., Giuliano, G., ... Bouzayen, M. (2014). The chimeric repressor version of an Ethylene Response Factor (ERF) family member, Sl-ERF.B3, shows contrasting effects on tomato fruit ripening. *New Phytologist*, 203(1), 206–218. <https://doi.org/10.1111/nph.12771>
- Liu, M., Pirrello, J., Chervin, C., Roustan, J.-P., & Bouzayen, M. (2015). *Update on Ethylene Control of Fruit Ripening Ethylene Control of Fruit Ripening: Revisiting the Complex Network of Transcriptional Regulation 1*. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01361>
- Liu, Y., & Zhang, S. (2004). Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in arabidopsis. *Plant Cell*, 16(12), 3386–3399. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.026609>
- Love, J., Bjorklund, S., Vahala, J., Hertzberg, M., Kangasjarvi, J., & Sundberg, B. (2009). Ethylene is an endogenous stimulator of cell division in the cambial meristem of Populus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(14), 5984–5989. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811660106>
- Ma, B., Cui, M. L., Sun, H. J., Takada, K., Mori, H., Kamada, H., & Ezura, H. (2006). Subcellular localization and membrane topology of the melon ethylene receptor CmERS1. *Plant Physiology*, 141(2), 587–597. <https://doi.org/10.1104/pp.106.080523>
- Ma, N., Xue, J., Li, Y., Liu, X., Dai, F., Jia, W., ... Gao, J. (2008). Rh-PIP2;1, a rose aquaporin gene, is involved in ethylene-regulated petal expansion. *Plant Physiology*, 148(2), 894–907. <https://doi.org/10.1104/pp.108.120154>
- Martin, M. N., & Saftner, R. A. (1995). Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid N-malnoyltransferase from tomato fruit. *Plant Physiology*, 108(3), 1241–1249. <https://doi.org/10.1104/pp.108.3.1241>
- Martinez, S., & Hausinger, R. P. (2015, August 21). Catalytic mechanisms of Fe(II)- and 2-Oxoglutarate-dependent oxygenases. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 290, pp. 20702–20711. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.648691>
- Massolo, J. F., González Forte, L., Concellón, A., Viña, S. Z., & Vicente, A. R. (2019). Effects of ethylene and 1-MCP on quality maintenance of fresh cut celery. *Postharvest Biology and Technology*, 148, 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.11.007>
- Meng, Y., Ma, N., Zhang, Q., You, Q., Li, N., Ali Khan, M., ... Gao, J. (2014). Precise spatio-temporal modulation of ACC synthase by MPK6 cascade mediates the response of rose flowers to rehydration. *The Plant Journal*, 79(6), 941–950. <https://doi.org/10.1111/tpj.12594>
- Mirica, L. M., & Klinman, J. P. (2008). The nature of O₂ activation by the ethylene-forming enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(6), 1814–1819. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711626105>
- Miyazaki, J. H., & Yang, S. F. (1987). The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 69(2), 366–370. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1987.tb04302.x>
- Mizukami, Y. (2001, December 1). A matter of size: Developmental control of organ size in

- plants. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol. 4, pp. 533–539. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00212-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00212-0)
- Morais, H., Caramori, P. H., Kogushi, M. S., & De Arruda Ribeiro, A. M. (2008). Escala fenológica detalhada da fase reprodutiva de *coffea arabica*. *Bragantia*, *67*(1), 257–260. <https://doi.org/10.1590/s0006-87052008000100031>
- Morris, D. A., & Larcombe, N. J. (1995). Phloem Transport and Conjugation of Foliar-Applied 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Journal of Plant Physiology*, *146*(4), 429–436. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)82004-3](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)82004-3)
- Moussatche, P., & Klee, H. J. (2004). *Autophosphorylation Activity of the Arabidopsis Ethylene Receptor Multigene Family**. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403100200>
- Müller-Dieckmann, H. J., Grantz, A. A., & Kim, S. H. (1999). The structure of the signal receiver domain of the *Arabidopsis thaliana* ethylene receptor ETR1. *Structure*, *7*(12), 1547–1556. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(00\)88345-8](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)88345-8)
- Mullins, E. D., McCollum, T. G., & McDonald, R. E. (2000). Consequences on ethylene metabolism of inactivating the ethylene receptor sites in diseased non-climacteric fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *19*(2), 155–164. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(00\)00077-6](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00077-6)
- Muñozmuñoz-Robredo, P., Rubio, P., Infante, R., Campos-Vargas, R., Manríquez, D., González-Agüero, M., & Defilippi, B. G. (2011). Ethylene biosynthesis in apricot: Identification of a ripening-related 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase (ACS) gene. *Postharvest Biology and Technology*, *63*, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.09.001>
- Murphy, L. J., Robertson, K. N., Harroun, S. G., Brosseau, C. L., Werner-Zwanziger, U., Moilanen, J., ... Clyburne, J. A. C. (2014). A simple complex on the verge of breakdown: Isolation of the elusive cyanofolate ion. *Science*, *344*(6179), 75–78. <https://doi.org/10.1126/science.1250808>
- Nakatsuka, A., Murachi, S., Okunishi, H., Shiomi, S., Nakano, R., Kubo, Y., & Inaba, A. (1998). Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiology*, *118*(4), 1295–1305. <https://doi.org/10.1104/pp.118.4.1295>
- Negi, S., Ivanchenko, M. G., & Muday, G. K. (2008). Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, *55*(2), 175–187. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03495.x>
- Nie, X., Singh, R. P., & Tai, G. C. C. (2002). Molecular characterization and expression analysis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homologs from potato under abiotic and biotic stresses. *Genome*, *45*(5), 905–913. <https://doi.org/10.1139/g02-062>
- O'Donnell, P. J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H. M. O., & Bowles, D. J. (1996). Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science*, *274*(5294), 1914–1917. <https://doi.org/10.1126/science.274.5294.1914>
- O'Malley, R. C., Rodriguez, F. I., Esch, J. J., Binder, B. M., O'Donnell, P., Klee, H. J., & Bleeker, A. B. (2005). Ethylene-binding activity, gene expression levels, and receptor system

output for ethylene receptor family members from Arabidopsis and tomato†. *The Plant Journal*, 41(5), 651–659. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02331.x>

Ohme-Takagi, M., & Shinshi, H. (1995). Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell*, 7(2), 173–182. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.2.173>

Özkaya, O., Yildirim, D., DüNDAR, Ö., & Tükel, S. S. (2016). Effects of 1-methylcyclopropene (1-MCP) and modified atmosphere packaging on postharvest storage quality of nectarine fruit. *Scientia Horticulturae*, 198, 454–461. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.12.016>

Paes, Â., Camargo, D. E., Bento, M., & De Camargo, P. (n.d.). *AGROMETEOROLOGIA DEFINIÇÃO E ESQUEMATIZAÇÃO DAS FASES FENOLÓGICAS DO CAFEIEIRO ARÁBICA NAS CONDIÇÕES TROPICAIS DO BRASIL (1)*.

Pak Dek, M. S., Padmanabhan, P., Subramanian, J., & Paliyath, G. (2018). Inhibition of tomato fruit ripening by 1-MCP, wortmannin and hexanal is associated with a decrease in transcript levels of phospholipase D and other ripening related genes. *Postharvest Biology and Technology*, 140, 50–59. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.02.009>

Park, C. H., Roh, J., Youn, J. H., Son, S. H., Park, J. H., Kim, S. Y., ... Kim, S. K. (2018). Arabidopsis ACC oxidase 1 coordinated by multiple signals mediates ethylene biosynthesis and is involved in root development. *Molecules and Cells*, 41(10), 923–932. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.0092>

Parkinson, C. L., Adams, K. L., & Palmer, J. D. (1999). Multigene analyses identify the three earliest lineages of extant flowering plants. *Current Biology*, 9(24), 1485–1491. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)80119-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)80119-0)

Parreiras Pereira, S., Ferreira Bartholo, G., Pereira Baliza, D., Moreira Sobreira, F., & José Guimarães, R. (n.d.). Crescimento, produtividade e bienalidade do cafeeiro em função do espaçamento de cultivo. In *Pesq. agropec. bras* (Vol. 46).

Paudel, J. R., & Bede, J. C. (2015). Ethylene Signaling Modulates Herbivore-Induced Defense Responses in the Model Legume *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(5), 569–579. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-14-0348-R>

Pei, H., Ma, N., Tian, J., Luo, J., Chen, J., Li, J., ... Gao, J. (2013). An NAC transcription factor controls ethylene-regulated cell expansion in flower petals. *Plant Physiology*, 163(2), 775–791. <https://doi.org/10.1104/pp.113.223388>

Peiser, G. D., Wang, T., Hoffman, N. E., Yang, S. F., Liut, H., WALSHt, C. T., & Stumpf, P. K. (1984). Formation of cyanide from carbon 1 of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid during its conversion to ethylene (f-cyanoalanine/cyanoformic acid/ethylene metabolism) Communicated by. In *Biochemistry* (Vol. 81).

Pelaz, S., Ditta, G. S., Baumann, E., Wisman, E., & Yanofsky, M. F. (2000). B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature*, 405(6783), 200–203. <https://doi.org/10.1038/35012103>

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 45e – 45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>

Picini, A. G., De Camargo, M. B. P., Ortolani, A. A., Fazuoli, L. C., & Gallo, P. B. (1999). Desenvolvimento e teste de modelos agrometeorológicos para a estimativa de produtividade do cafeeiro. *Bragantia*, 58(1), 157–170. <https://doi.org/10.1590/s0006-87051999000100015>

- Pierik, R., Sasidharan, R., & Voeselek, L. A. C. J. (2007, June 10). Growth control by ethylene: Adjusting phenotypes to the environment. *Journal of Plant Growth Regulation*, Vol. 26, pp. 188–200. <https://doi.org/10.1007/s00344-006-0124-4>
- Pierik, R., Tholen, D., Poorter, H., Visser, E. J. W., & Voeselek, L. A. C. J. (2006). The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends in Plant Science*, 11(4), 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.02.006>
- Pimenta, C. J., & Vilela, E. R. (2003). Efeito do tipo e época de colheita na qualidade do café (*Coffea arabica* L.). *Acta Scientiarum. Agronomy*, 25(1), 131–136. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v25i1.2464>
- Pirrello, J., Prasad, B. C. N., Zhang, W., Chen, K., Mila, I., Zouine, M., ... Bouzayen, M. (2012). Functional analysis and binding affinity of tomato ethylene response factors provide insight on the molecular bases of plant differential responses to ethylene. *BMC Plant Biology*, 12, 190. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-190>
- Potuschak, T., Lechner, E., Parmentier, Y., Yanagisawa, S., Grava, S., Koncz, C., & Genschik, P. (2003). EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two Arabidopsis F box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell*, 115(6), 679–689. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00968-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00968-1)
- Protasio Pereira, L. F., Galvão, R. M., Kobayashi, A. K., Cação, S. M. B., & Esteves Vieira, L. G. (2005). Ethylene production and acc oxidase gene expression during fruit ripening of *Coffea arabica* L. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17(3), 283–289. <https://doi.org/10.1590/s1677-04202005000300002>
- Qiao, H., Shen, Z., Huang, S. S. C., Schmitz, R. J., Urich, M. A., Briggs, S. P., & Ecker, J. R. (2012). Processing and subcellular trafficking of ER-tethered EIN2 control response to ethylene gas. *Science*, 338(6105), 390–393. <https://doi.org/10.1126/science.1225974>
- Qu, X., & Schaller, G. E. (2004). Requirement of the histidine kinase domain for signal transduction by the ethylene receptor ETR1. *Plant Physiology*, 136(2), 2961–2970. <https://doi.org/10.1104/pp.104.047126>
- Rena, A. B. (n.d.). *Floração Do Cafeeiro : Um Enigma*.
- Rickes, L. N., Klumb, E. K., Benitez, L. C., Braga, E. J. B., & Bianchi, V. J. (2019). Differential expression of the genes involved in responses to water-deficit stress in peach trees cv. Chimarrita grafted onto two different rootstocks. *Bragantia*, 78(1), 60–70. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.2017372>
- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C. Z., Keddie, J., ... Yu, G. L. (2000). Arabidopsis transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, 290(5499), 2105–2110. <https://doi.org/10.1126/science.290.5499.2105>
- Riov, J., Dagan, E., Goren, R., & Yang, S. F. (1990). Characterization of abscisic acid-induced ethylene production in citrus leaf and tomato fruit tissues. *Plant Physiology*, 92(1), 48–53. <https://doi.org/10.1104/pp.92.1.48>
- Robles, L., Stepanova, A., & Alonso, J. (2013). Molecular Mechanisms of Ethylene-Auxin Interaction. *Molecular Plant*, 6, 1734–1737. <https://doi.org/10.1093/mp/sst113>
- Rocha, O. C., Guerra, A. F., Rodrigues, G. C., Sanzonowicz, C., Silva, F. A. M. d., Ribeiro, L. F., & Toledo, P. M. dos R. (2007). Manejo estratégico de irrigação para a cultura do café (*Coffea arabica* L.) no cerrado brasileiro.

- <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/10820/1687>. Retrieved from http://hdl.handle.net/10820/1687%5Cnhttp://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/10820/1687/179995_Art112f.pdf?sequence=1
- Rocklin, A. M., Kato, K., Liu, H. W., Que, L., & Lipscomb, J. D. (2004). Mechanistic studies of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase: Single turnover reaction. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 9(2), 171–182. <https://doi.org/10.1007/s00775-003-0510-3>
- RODRIGUES, J. P. B. (2015). *Efeito Do Mathury™ E Ethephon Na Maturação Dos Frutos E Qualidade Da Bebida De Café*. Retrieved from <http://uenf.br/posgraduacao/producao-vegetal/wp-content/uploads/sites/10/2015/08/Dissertação-João-Paulo-Braga-Rodrigues.pdf>
- Rottmann, W. H., Peter, G. F., Oeller, P. W., Keller, J. A., Shen, N. F., Nagy, B. P., ... Theologis, A. (1991). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by a multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence. *Journal of Molecular Biology*, 222(4), 937–961. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90587-V](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90587-V)
- Ruduś, I., Sasiak, M., & Kepczyński, J. (2013). Regulation of ethylene biosynthesis at the level of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO) gene. *Acta Physiologiae Plantarum*, Vol. 35, pp. 295–307. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1096-6>
- Sá, C. R. L., Silva, E. O., Terao, D., & Saraiva, A. C. M. (2008). Métodos de Controle do Etileno na Qualidade e Conservação Pós-Colheita de Frutas. *Embrapa Agroindústria Tropical*, 36.
- Ságio, S. A., Barreto, H. G., Lima, A. A., Moreira, R. O., Rezende, P. M., Paiva, L. V., & Chalfun-Junior, A. (2014). Identification and expression analysis of ethylene biosynthesis and signaling genes provides insights into the early and late coffee cultivars ripening pathway. *Planta*, 239(5), 951–963. <https://doi.org/10.1007/s00425-014-2026-1>
- Sakai, H., Hua, J., Chen, Q. G., Chang, C., Medrano, L. J., Bleecker, A. B., & Meyerowitz, E. M. (1998). ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in Arabidopsis. In *Plant Biology* (Vol. 95). Retrieved from www.pnas.org.
- Saleh-Lakha, S., Grichko, V. P., Sisler, E. C., & Glick, B. R. (2004). The effect of the ethylene action inhibitor 1-cyclopropenylmethyl butyl ether on early plant growth. *Journal of Plant Growth Regulation*, 23(4), 307–312. <https://doi.org/10.1007/s00344-004-0011-9>
- Sangtarash, M. H., Qaderi, M. M., Chinnappa, C. C., & Reid, D. M. (2009). Differential sensitivity of canola (*Brassica napus*) seedlings to ultraviolet-B radiation, water stress and abscisic acid. *Environmental and Experimental Botany*, 66(2), 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.03.004>
- Santos, I. S. (2016). Influência do etileno na regulação do florescimento de *Coffea arabica* L.". *Dissertação: Universidade Federal De Lavras*.
- Sasidharan, R., & Voeselek, L. A. C. J. (1991). *Ethylene-Mediated Acclimations to Flooding Stress I*. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00387>
- Savada, R. P., Ozga, J. A., Jayasinghege, C. P. A., Waduthanthri, K. D., & Reinecke, D. M. (2017). Heat stress differentially modifies ethylene biosynthesis and signaling in pea floral and fruit tissues. *Plant Molecular Biology*, 95(3), 313–331. <https://doi.org/10.1007/s11103-017-0653-1>
- Schachtman, D. P., & Goodger, J. Q. D. (2008, June 1). Chemical root to shoot signaling under drought. *Trends in Plant Science*, Vol. 13, pp. 281–287.

<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.04.003>

Schiefelbein, J. W. (2000). Constructing a plant cell. The genetic control of root hair development. *Plant Physiology*, 124(4), 1525–1531. <https://doi.org/10.1104/pp.124.4.1525>

Schroeder, J. I., Allen, G. J., Hugouvieux, V., Kwak, J. M., & Waner, D. (2001). GUARD CELL SIGNAL TRANSDUCTION. In *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* (Vol. 52). Retrieved from www.annualreviews.org

Sebastià, C. H., Hardin, S. C., Clouse, S. D., Kieber, J. J., & Huber, S. C. (2004). Identification of a new motif for CDPK phosphorylation in vitro that suggests ACC synthase may be a CDPK substrate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 428(1), 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.04.025>

Seki, M., Umezawa, T., Urano, K., & Shinozaki, K. (2007, June). Regulatory metabolic networks in drought stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, Vol. 10, pp. 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.014>

Sell, S., & Hehl, R. (2005). A fifth member of the tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) oxidase gene family harbours a leucine zipper and is anaerobically induced. *DNA Sequence - Journal of DNA Sequencing and Mapping*, 16(1), 80–82. <https://doi.org/10.1080/10425170500050817>

Seo, Y. S., Yoo, A., Jung, J., Sung, S. K., Yang, D. R., Kim, W. T., & Lee, W. (2004). The active site and substrate-binding mode of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase determined by site-directed mutagenesis and comparative modelling studies. *Biochemical Journal*, 380(2), 339–346. <https://doi.org/10.1042/BJ20031762>

Serek, E. C. S. M. (1999). Compounds controlling the ethylene receptor. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*.

Serek, M., & Sisler, E. C. (2001). Efficacy of inhibitors of ethylene binding in improvement of the postharvest characteristics of potted flowering plants. *Postharvest Biology and Technology*, 23(2), 161–166. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(01\)00109-0](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(01)00109-0)

Seymour, G. B., Chapman, N. H., Chew, B. L., & Rose, J. K. C. (2013, April). Regulation of ripening and opportunities for control in tomato and other fruits. *Plant Biotechnology Journal*, Vol. 11, pp. 269–278. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00738.x>

Shakeel, S. N., Wang, X., Binder, B. M., & Schaller, G. E. (2013). Mechanisms of signal transduction by ethylene: Overlapping and non-overlapping signalling roles in a receptor family. *AoB PLANTS*, Vol. 5. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plt010>

Sharp, R. E. (2002). Interaction with ethylene: Changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25(2), 211–222. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2002.00798.x>

Sharp, R. E., Wu, Y., Voetberg, G. S., Saab, I. N., & LeNoble, M. E. (1994). Confirmation that abscisic acid accumulation is required for maize primary root elongation at low water potentials. *Journal of Experimental Botany*, 45(Special_Issue), 1743–1751. https://doi.org/10.1093/jxb/45.special_issue.1743

Shaw, J. F., Chou, Y. S., Chang, R. C., & Yang, S. F. (1996). Characterization of the ferrous ion binding sites of apple 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase by site-directed mutagenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 225(3), 697–700. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1237>

- Shi, L. S., & Liu, J. P. (2016). Molecular cloning and expression analysis of an 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene from *Oncidium Gower Ramsey*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *469*(2), 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.11.107>
- Shi, Y. H., Zhu, S. W., Mao, X. Z., Feng, J. X., Qin, Y. M., Zhang, L., ... Zhu, Y. X. (2006). Transcriptome profiling, molecular biological, and physiological studies reveal a major role for ethylene in cotton fiber cell elongation. *Plant Cell*, *18*(3), 651–664. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.040303>
- Shinohara, T., Martin, E. A., & Leskovar, D. I. (2017). Ethylene regulators influence germination and root growth of globe artichoke seedlings exposed to heat stress conditions. *Seed Science and Technology*, *45*(1), 167–178. <https://doi.org/10.15258/sst.2017.45.1.07>
- Siqueira, H. H. de, & Abreu, C. M. P. de. (2006). Composição físico-química e qualidade do café submetido a dois tipos de torração e com diferentes formas de processamento. *Ciência e Agrotecnologia*, *30*(1), 112–117. <https://doi.org/10.1590/s1413-70542006000100016>
- Sisler, E. C., & Serek, M. (1997a). Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. *Physiologia Plantarum*, *100*(3), 577–582. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb03063.x>
- Sisler, E. C., & Serek, M. (1997b). Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. *Physiologia Plantarum*, *100*(3), 577–582. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1997.1000320.x>
- Sisler, Edward C. (2006, July). The discovery and development of compounds counteracting ethylene at the receptor level. *Biotechnology Advances*, Vol. 24, pp. 357–367. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.01.002>
- Sisler, Edward C., Alwan, T., Goren, R., Serek, M., & Apelbaum, A. (2003). 1-Substituted cyclopropenes: Effective blocking agents for ethylene action in plants. *Plant Growth Regulation*, *40*(3), 223–228. <https://doi.org/10.1023/A:1025080420990>
- Sisler, Edward C., Serek, M., Dupille, E., & Goren, R. (1999). Inhibition of ethylene responses by 1-Methylcyclopropene and 3-Methylcyclopropene. *Plant Growth Regulation*, *27*(2), 105–111. <https://doi.org/10.1023/A:1006153016409>
- Sisler, Edward C, Serek, M., Dupille, E., & Goren, R. (1999). Inhibition of ethylene responses by 1-Methylcyclopropene and 3-Methylcyclopropene. In *Plant Growth Regulation* (Vol. 27).
- Soares, A. R., Mantovani, E. C., Rena, A. B., & Soares, A. A. (2005). Irrigação e fisiologia da floração em cafeeiros adultos na região da zona da mata de Minas Gerais. *Acta Scientiarum. Agronomy*, *27*(1), 117–125. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v27i1.2128>
- Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q., & Ecker, J. R. (1998). Nuclear events in ethylene signaling: A transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes and Development*, *12*(23), 3703–3714. <https://doi.org/10.1101/gad.12.23.3703>
- Spollen, W. G., Lenoble, M. E., Samuels, T. D., Bernstein, N., & Sharp, R. E. (2000). Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant Physiology*, *122*(3), 967–976. <https://doi.org/10.1104/pp.122.3.967>
- Staswick, P. E., & Tiryaki, I. (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an

enzyme that conjugate it to isoleucine in Arabidopsis W inside box sign. *Plant Cell*, *16*(8), 2117–2127. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.023549>

Steibel, J. P., Poletto, R., Coussens, P. M., & Rosa, G. J. M. (2009). A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. *Genomics*, *94*(2), 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2009.04.008>

Stepanova, A. N., & Alonso, J. M. (2005). Ethylene signalling and response pathway: a unique signalling cascade with a multitude of inputs and outputs. *Physiologia Plantarum*, *123*(2), 195–206. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00447.x>

Subbiah, V., & Reddy, K. J. (2010). Interactions between ethylene, abscisic acid and cytokinin during germination and seedling establishment in Arabidopsis. *Journal of Biosciences*, *35*(3), 451–458. <https://doi.org/10.1007/s12038-010-0050-2>

Sun, Xiangzhong, Li, Y., He, W., Ji, C., Xia, P., Wang, Y., ... Guo, H. (2017). Pyrazinamide and derivatives block ethylene biosynthesis by inhibiting ACC oxidase. *Nature Communications*, *8*. <https://doi.org/10.1038/ncomms15758>

Sun, Xiaoming, Zhao, T., Gan, S., Ren, X., Fang, L., Karungo, S. K., ... Xin, H. (2016). Ethylene positively regulates cold tolerance in grapevine by modulating the expression of ETHYLENE RESPONSE FACTOR 057. *Scientific Reports*, *6*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep24066>

Sylvia, M., & Pirrung, M. C. (1996). *United States Patent (19)*. (19).

Tang, X., Wang, H., Brandt, A. S., & Woodson, W. R. (1993). Organization and structure of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family from *Petunia hybrida*. *Plant Molecular Biology*, *23*(6), 1151–1164. <https://doi.org/10.1007/BF00042349>

Tang, X., & Woodson, W. R. (1996). Temporal and spatial expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase mRNA following pollination of immature and mature petunia flowers. *Plant Physiology*, *112*(2), 503–511. <https://doi.org/10.1104/pp.112.2.503>

Tatsuki, M., & Mori, H. (2001). Phosphorylation of Tomato 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid Synthase, LE-ACS2, at the C-terminal Region. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(30), 28051–28057. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101543200>

Thongkum, M., Imsabai, W., Burns, P., McAtee, P. A., Schaffer, R. J., Allan, A. C., & Ketsa, S. (2018). The effect of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on expression of ethylene receptor genes in durian pulp during ripening. *Plant Physiology and Biochemistry*, *125*, 232–238. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.02.004>

Tian, M. S., Prakash, S., Elgar, H. J., Young, H., Burmeister, D. M., & Ross, G. S. (2000). Responses of strawberry fruit to 1-methylcyclopropene (1-MCP) and ethylene. *Plant Growth Regulation*, *32*(1), 83–90. <https://doi.org/10.1023/A:1006409719333>

Tieman, D M, Ciardi, J. A., Taylor, M. G., & Klee, H. J. (2001). Members of the tomato LeEIL (EIN3-like) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, *26*(1), 47–58. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01006.x>

Tieman, Denise M, Taylor, M. G., Ciardi, J. A., & Klee, H. J. (n.d.). *The tomato ethylene receptors NR and LeETR4 are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family*. Retrieved from

www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.090550597

Toivonen, P. M. A., & Lu, C. (2005). Studies on elevated temperature, short-term storage of “Sunrise” Summer apples using 1-MCP to maintain quality. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *80*(4), 439–446. <https://doi.org/10.1080/14620316.2005.11511957>

Tombesi, S., Frioni, T., Poni, S., & Palliotti, A. (2018). Effect of water stress “memory” on plant behavior during subsequent drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, *150*, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.03.009>

Trevenzoli Favero, B., Poimenopoulou, E., Himmelboe, M., Stergiou, T., Müller, R., & Lütken, H. (2016). Efficiency of 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatment after ethylene exposure of mini-Phalaenopsis. *Scientia Horticulturae*, *211*, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.08.010>

Trivellini, A., Ferrante, A., Vernieri, P., & Serra, G. (2011). Effects of abscisic acid on ethylene biosynthesis and perception in *Hibiscus rosa-sinensis* L. flower development. *Journal of Experimental Botany*, *62*(15), 5437–5452. <https://doi.org/10.1093/jxb/err218>

Tsuchisaka, A., & Theologis, A. (2004a). Unique and overlapping expression patterns among the Arabidopsis 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. *Plant Physiology*, *136*(2), 2982–3000. <https://doi.org/10.1104/pp.104.049999>

Tsuchisaka, A., & Theologis, A. (2004b). Unique and overlapping expression patterns among the Arabidopsis 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. *Plant Physiology*, *136*(2), 2982–3000. <https://doi.org/10.1104/pp.104.049999>

Tsuchisaka, A., Yu, G., Jin, H., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Zhang, X., ... Theologis, A. (2009). A combinatorial interplay among the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate isoforms regulates ethylene biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, *183*(3), 979–1003. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.107102>

Tu, Y., He, B., Gao, S., Guo, D., Jia, X., Dong, X., & Guo, M. (2019). CTACO1 overexpression resulted in the alteration of the flavonoids profile of safflower. *Molecules*, *24*(6). <https://doi.org/10.3390/molecules24061128>

Tucker, M. L., Xue, P., & Yang, R. (2010). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) concentration and ACC synthase expression in soybean roots, root tips, and soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*)-infected roots. *Journal of Experimental Botany*, *61*(2), 463–472. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp317>

Tudela, D., & Primo-Millo, E. (1992). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid transported from roots to shoots promotes leaf abscission in cleopatra mandarin (*Citrus reshni* Hort, ex tan.) seedlings rehydrated after water stress. *Plant Physiology*, *100*(1), 131–137. <https://doi.org/10.1104/pp.100.1.131>

Tutar, Y. (2012). Pseudogenes. *Comparative and Functional Genomics*, Vol. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/424526>

Valadares, S. V., Neves, J. C. L., Rosa, G. N. G. P., Martinez, H. E. P., Venegas, V. H. A., & de Lima, P. C. (2013). Produtividade e bienalidade da produção de cafezais adensados, sob diferentes doses de N e K. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, *48*(3), 296–303. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000300008>

Van de Poel, B., Vandenzavel, N., Smet, C., Nicolay, T., Bulens, I., Mellidou, I., ... Geeraerd, A. H. (2014). Tissue specific analysis reveals a differential organization and regulation of

both ethylene biosynthesis and E8 during climacteric ripening of tomato. *BMC Plant Biology*, 14(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-11>

Van Der Straeten, D., Anuntalabhochai, S., Van Caeneghem, W., Zhou, Z., Gielen, J., & Van Montagu, M. (1997). Expression of three members of the ACC synthase gene family in deepwater rice by submergence, wounding and hormonal treatments. *Plant Science*, 124(1), 79–87. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(97\)04609-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(97)04609-8)

Van Der Straeten, D., Rodrigues-Pousada, R. A., Villarroel, R., Hanley, S., Goodmant, H. M., & Van Montagu, M. (1992). *Plant Biology Cloning, genetic mapping, and expression analysis of an Arabidopsis thaliana gene that encodes 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (development/ethylene/gene regulation/restriction fragment length polymorphism mapping/stress)* (Vol. 89).

van Es, S. W., Silveira, S. R., Rocha, D. I., Bimbo, A., Martinelli, A. P., Dornelas, M. C., ... Immink, R. G. H. (2018). Novel functions of the Arabidopsis transcription factor TCP5 in petal development and ethylene biosynthesis. *Plant Journal*, 94(5), 867–879. <https://doi.org/10.1111/tj.13904>

Vanderstraeten, L., & van Der Straeten, D. (2017, January 24). Accumulation and transport of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: Current status, considerations for future research and agronomic applications. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00038>

Vanin, E. F. (1985). PROCESSED PSEUDOGENES: CHARACTERISTICS AND EVOLUTION. In *Ann. Rev. Genet* (Vol. 19). Retrieved from www.annualreviews.org

Ververidis, P., & John, P. (1991). Complete recovery in vitro of ethylene-forming enzyme activity. *Phytochemistry*. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)85241-Q](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)85241-Q)

Villegente, M., Marmey, P., Job, C., Galland, M., Cueff, G., Godin, B., ... Job, D. (2017). A Combination of Histological, Physiological, and Proteomic Approaches Shed Light on Seed Desiccation Tolerance of the Basal Angiosperm *Amborella trichopoda*. *Proteomes*, 5(4), 19. <https://doi.org/10.3390/proteomes5030019>

Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R. K., ... Sharma, S. (2017, February 20). Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: A review on current knowledge and future prospects. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00161>

Vukašinović, N., Cvrčková, F., Eliáš, M., Cole, R., Fowler, J. E., Žárský, V., & Synek, L. (2014). Dissecting a hidden gene duplication: The arabidopsis thaliana SEC10 locus. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094077>

Wang, D., Fan, J., & Ranu, R. S. (2004). Cloning and expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase cDNA from rosa (*Rosa x hybrida*). *Plant Cell Reports*, 22(6), 422–429. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0721-7>

Wang, J. H., Gu, K. Di, Han, P. L., Yu, J. Q., Wang, C. K., Zhang, Q. Y., ... Hao, Y. J. (2020). Apple ethylene response factor MdERF11 confers resistance to fungal pathogen *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Science*, 291, 110351. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110351>

Wang, K. L. C., Yoshida, H., Lurin, C., & Ecker, J. R. (2004). Regulation of ethylene gas biosynthesis by the Arabidopsis ETO1 protein. *Nature*, 428(6986), 945–950.

<https://doi.org/10.1038/nature02516>

Wang, P., Moore, B. M., Panchy, N. L., Meng, F., Lehti-Shiu, M. D., & Shiu, S. H. (2018). Factors influencing gene family size variation among related species in a plant family, solanaceae. *Genome Biology and Evolution*, *10*(10), 2596–2613.

<https://doi.org/10.1093/gbe/evy193>

Wang, W., Hall, A. E., O'Malley, R., & Bleecker, A. B. (2003). Canonical histidine kinase activity of the transmitter domain of the ETR1 ethylene receptor from Arabidopsis is not required for signal transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(1), 352–357. <https://doi.org/10.1073/pnas.0237085100>

Wani, S. H., Kumar, V., Shriram, V., & Sah, S. K. (2016, June 1). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *Crop Journal*, Vol. 4, pp. 162–176. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2016.01.010>

Watkins, C B. (2008). *POSTHARVEST RIPENING REGULATION AND INNOVATION IN STORAGE TECHNOLOGY* / *International Society for Horticultural Science*. 2, 51–58. Retrieved from http://www.ishs.org/ishs-article/796_4

Watkins, Chris B. (2006, July). The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. *Biotechnology Advances*, Vol. 24, pp. 389–409. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.01.005>

Wen, X., Zhang, C., Ji, Y., Zhao, Q., He, W., An, F., ... Guo, H. (2012, November). Activation of ethylene signaling is mediated by nuclear translocation of the cleaved EIN2 carboxyl terminus. *Cell Research*, Vol. 22, pp. 1613–1616. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.145>

Wen, Y.-Z., Zheng, L.-L., Qu, L.-H., Ayala, F. J., & Lun, Z.-R. (2012). Pseudogenes are not pseudo any more. *RNA Biology*, *9*(1), 27–32. <https://doi.org/10.4161/rna.9.1.18277>

Wilkinson, J. Q., Lanahan, M. B., Clark, D. G., Bleecker, A. B., Chang, C., Meyerowitz, E. M., & Klee, H. J. (1997). A Dominant Mutant Receptor From Arabidopsis Confers Ethylene Insensitivity In Heterologous Plants. *Nature Biotechnology*, *15*(5), 444–447. <https://doi.org/10.1038/nbt0597-444>

Wilkinson, S., Kudoyarova, G. R., Veselov, D. S., Arkhipova, T. N., & Davies, W. J. (2012). Plant hormone interactions: innovative targets for crop breeding and management. *Journal of Experimental Botany*, *63*(9), 3499–3509. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers148>

Win, N. M., Yoo, J., Kwon, S.-I., Watkins, C. B., & Kang, I.-K. (2019). Characterization of Fruit Quality Attributes and Cell Wall Metabolism in 1-Methylcyclopropene (1-MCP)-Treated ‘Summer King’ and ‘Green Ball’ Apples During Cold Storage. *Frontiers in Plant Science*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01513>

Wolters, H., & Jürgens, G. (2009, May). Survival of the flexible: Hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nature Reviews Genetics*, Vol. 10, pp. 305–317. <https://doi.org/10.1038/nrg2558>

Wu, Y.-S., & Yang, C.-Y. (2019). Ethylene-mediated signaling confers thermotolerance and regulates transcript levels of heat shock factors in rice seedlings under heat stress. *Botanical Studies*, *60*(1). <https://doi.org/10.1186/s40529-019-0272-z>

Xie, J., Li, Y., Liu, X., Zhao, Y., Li, B., Ingvarsson, P. K., & Zhanga, D. (2019). Evolutionary origins of pseudogenes and their association with regulatory sequences in plants. *Plant Cell*,

31(3), 563–578. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00601>

Yamagami, T., Tsuchisaka, A., Yamada, K., Haddon, W. F., Harden, L. A., & Theologis, A. (2003). Biochemical diversity among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase isozymes encoded by the Arabidopsis gene family. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(49), 49102–49112. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308297200>

YANG, J. C., ZHANG, J. H., YE, Y. X., WANG, Z. Q., ZHU, Q. S., & LIU, L. J. (2004). Involvement of abscisic acid and ethylene in the responses of rice grains to water stress during filling. *Plant, Cell and Environment*, 27(8), 1055–1064. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01210.x>

Yang, L., Takuno, S., Waters, E. R., & Gaut, B. S. (2011). Lowly Expressed Genes in Arabidopsis thaliana Bear the Signature of Possible Pseudogenization by Promoter Degradation. *Molecular Biology and Evolution*, 28(3), 1193–1203. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq298>

Yang, X., Song, J., Campbell-Palmer, L., Fillmore, S., & Zhang, Z. (2013). Effect of ethylene and 1-MCP on expression of genes involved in ethylene biosynthesis and perception during ripening of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 78, 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.11.012>

Yokotani, N. (2003). Characterization of a novel tomato EIN3-like gene (LeEIL4). *Journal of Experimental Botany*, 54(393), 2775–2776. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg308>

Yoo, A., Seo, Y. S., Jung, J. W., Sung, S. K., Kim, W. T., Lee, W., & Yang, D. R. (2006). Lys296 and Arg299 residues in the C-terminus of MD-ACO1 are essential for a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase enzyme activity. *Journal of Structural Biology*, 156(3), 407–420. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.08.012>

Yoon, G. M. (2015). New insights into the protein turnover regulation in ethylene biosynthesis. *Molecules and Cells*, Vol. 38, pp. 597–603. <https://doi.org/10.14348/molcells.2015.0152>

Yoshida, H., Nagata, M., Saito, K., Wang, K. L., & Ecker, J. R. (2005). *BMC Plant Biology Arabidopsis ETO1 specifically interacts with and negatively regulates type 2 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthases*. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-5-14>

Young, T. E., Gallie, D. R., & DeMason, D. A. (1997). Ethylene-mediated programmed cell death during maize endosperm development of wild-type and shrunken2 genotypes. *Plant Physiology*, 115(2), 737–751. <https://doi.org/10.1104/pp.115.2.737>

Yu, J., Ke, T., Tehrim, S., Sun, F., Liao, B., & Hua, W. (2015). PTGBase: an integrated database to study tandem duplicated genes in plants. *Database*, 2015. <https://doi.org/10.1093/database/bav017>

Yu, W., Sheng, J., Zhao, R., Wang, Q., Ma, P., & Shen, L. (2019). Ethylene biosynthesis is involved in regulating chilling tolerance and SICBF1 gene expression in tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 149, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.11.012>

Yu, Y. B., Adams, D. O., & Yang, S. F. (1979). 1-Aminocyclopropanecarboxylate synthase, a key enzyme in ethylene biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90420-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90420-X)

Zarembinski, T. I., & Theologis, A. (1997). Expression characteristics of OS-ACS1 and OS-

- ACS2, two members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in rice (*Oryza sativa* L. cv. Habiganj Aman II) during partial submergence. *Plant Molecular Biology*, 33(1), 71–77. <https://doi.org/10.1023/B:PLAN.0000009693.26740.c3>
- Zhang, C., Zhang, L., Zhang, S., Zhu, S., Wu, P., Chen, Y., ... Wu, G. (2015). Global analysis of gene expression profiles in physic nut (*Jatropha curcas* L.) seedlings exposed to drought stress. *BMC Plant Biology*, 15(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0397-x>
- Zhang, Z., Ren, J. S., Clifton, I. J., & Schofield, C. J. (2004). Crystal structure and mechanistic implications of 1-aminocyclopropane-1- carboxylic acid oxidase - The ethylene-forming enzyme. *Chemistry and Biology*, 11(10), 1383–1394. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.08.012>
- Zhong, G., Huberman, M., Feng, X. Q., Sisler, E. C., Holland, D., & Goren, R. (2001). Effect of 1-methylcyclopropene on ethylene-induced abscission in citrus. *Physiologia Plantarum*, 113(1), 134–141. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1130118.x>
- Zhou, Z. Y. (2009, March 1). An overview of fossil Ginkgoales. *Palaeoworld*, Vol. 18, pp. 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.palwor.2009.01.001>

CAPÍTULO 4

Perspectivas Futuras

1 PERSPECTIVAS FUTURAS

Um questionamento recorrente sobre a hipótese apresentada nesse estudo é:

“Porque não aplicar etileno nas plantas?”

Em 2014, logo após a constatação da antese promovida pelo 1-MCP, alguns experimentos foram desenvolvidos afim de avançar no entendimento do florescimento do cafeeiro regulado pelo etileno. No primeiro experimento a calda foi composta por 1,3mL de etileno (Ethrel 720) diluído em 3L de água, pulverizada com auxílio de pulverizador costal em cafeeiros da cv Catuaí 144 de 5 anos de idade (figura 22A). Cerca de 24 horas após a pulverização (figura 22B) foi verificado abscisão significativa de folhas e frutos. Nitidamente a dose utilizada no primeiro experimento causou graves prejuízos a planta, então um segundo experimento com Ethrel foi realizado em 2018. Metade da dose foi utilizada e novamente efeitos indesejáveis ocorreram. Embora a queima e abscisão abrupta não tenha ocorrido, o amarelecimento das folhas é uma resposta evidente de elevadas concentrações de etileno na planta. Mais dois ensaios foram realizados em 2018 com concentrações de Ethrel inferiores (0,25mL e 0,5mL) às utilizadas no ensaio anterior e nenhuma resposta fenotípica ao etileno foi identificada (*dados não mostrados*). Isso levantou o questionamento sobre a relação dose-resposta: como determinar a dose ideal de Ethrel para assegurar que a ausência de antese não resulte de dosagem inadequada, assim como uma dose elevada promove efeitos deletérios? Considerando que o objetivo do estudo se tornou entender a regulação da antese pelo etileno, e a pulverização do 1-MCP não promoveu nenhum dano as plantas, as análises foram direcionadas para entender o mecanismo de controle do 1-MCP nesse processo.

Figura 22 – Experimentos realizados com pulverização de Ethrel[®] 720 em *Coffea arabica*.

(A)



(B)



Legenda: (A) cv Catuaí 144 na área experimental da Universidade Federal de Lavras, Lavras - 2014 e (B) cv Topázio MG 1190 na área experimental da Fundação Procafé, Boa Esperança - 2018.
Fonte: Do autor (2020).

Nesse contexto, considerações á pesquisas futuras para essa linha de pesquisa será direcionada em cronograma de curto, médio e longo prazo. A curto prazo, futuros trabalhos poderiam focar nas análises *in silico*, dando continuidade as análises de identificação de novos receptores do etileno. Além disso, sequenciar os prováveis genes das vias de biossíntese e sinalização identificados seria importante para validar as análises *in silico*. A médio prazo, a caracterização funcional das enzimas ACS e AO é de grande importância para assegurar a atividade biológica dessas enzimas. Questões importantes como a produção e o transporte do ACC é uma outra linha de estudo que merece destaque, considerando a relevância que esse evento parece desempenhar durante o florescimento. A identificação de transportadores poderia auxiliar na compreensão sobre a translocação dessa molécula da raiz para parte aérea. Ainda sobre o ACC, seria interessante quantificar a seiva do xilema antes e após reidratação e associar esse fluxo a expressão dos transportadores previamente identificados. Além disso, supostamente se acredita que o ACC produzido pelo estímulo do 1-MCP não é transportado via floema, mas até o presente isso também não está confirmado. A longo prazo, utilizar espécie modelo como ferramenta para expressão heteróloga seria uma etapa importante para avançar na identificação do mecanismo pelo qual o 1-MCP regula a retroalimentação da biossíntese do etileno. O MicroTom já foi testado (figura 23) como modelo de estudo de algumas variáveis (quantidade e qualidade de folhas e flores) após pulverização de 1-MCP e Ethrel®, e é uma excelente opção para desenvolver estudos visando explorar o efeito do nocaute ou superexpressão de genes responsivos ao 1-MCP identificados nesse estudo.

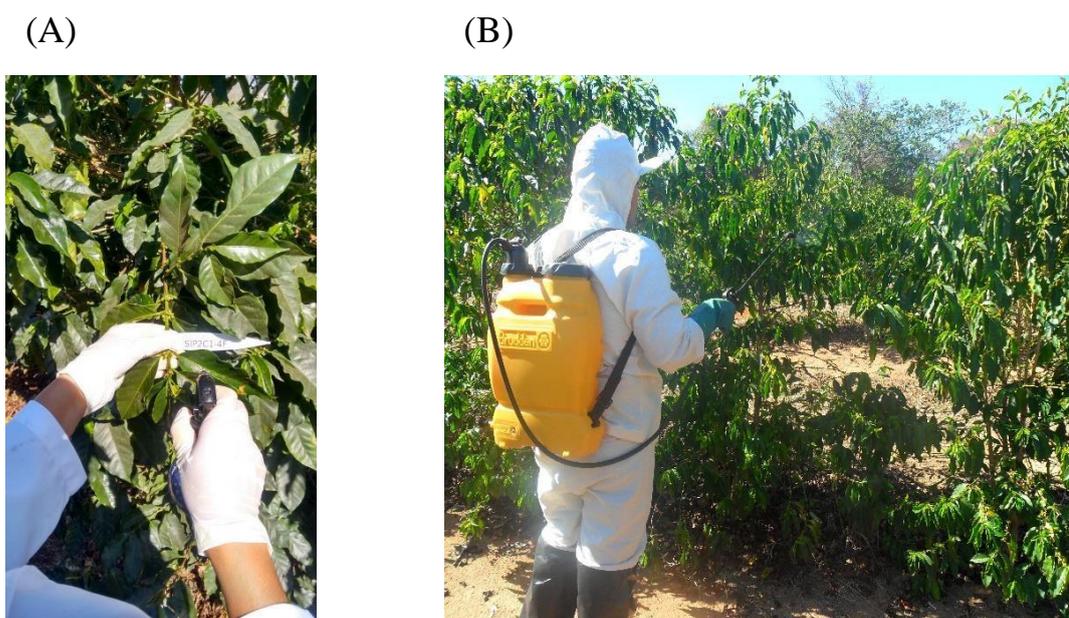
Figura 23 – Ensaio realizado com a planta modelo MicroTom.



Fonte: Do autor (2020).

A tecnologia de aplicação é outro ponto chave para o sucesso dessa pesquisa. Ensaios prévios mostraram que a pulverização localizada nas gemas da calda com 1-MCP (figura 24A) foi mais eficiente na promoção da antese (*dados não mostrados*) do que a aplicação abrangendo a planta inteira (figura 24B). O desenvolvimento de práticas mais modernas e eficientes para aplicação do 1-MCP poderá acarretar em resultados mais satisfatórios.

Figura 24 – Pulverização de calda de 1MCP em plantas de *Coffea arabica*.



Legenda: (A) Pulverização utilizando borrifador com aplicação localizada nas gemas em ramos selecionados, (B) Pulverização utilizando pulverizador costal com aplicação na parte aérea (planta inteira), abrangendo as regiões adaxial e abaxial das folhas, bem como as gemas.

Fonte: Do autor (2020).

Identificar mecanismos associados com a regulação do florescimento do cafeeiro é essencial para ampliar o entendimento sobre as vias que podem controlar a antese nessa espécie. Atualmente, há evidências crescentes de que o etileno pode estar associado com a floração de *Coffea arabica*. Os resultados alcançados através da utilização do 1-MCP poderão embasar uma técnica inovadora para o manejo da cultura já que a utilização de produtos comerciais que auxiliem no controle da antese e na extensão da indução do florescimento do cafeeiro é algo inexistente no mercado.

2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A compreensão de eventos associados com a abertura da flor contribui significativamente para esclarecer os processos vinculados ao florescimento, mas a antese é apenas uma das fases do desenvolvimento floral do cafeeiro. Resolver o gargalo existente na sincronização dos botões florais para uniformização da florada é uma missão ambiciosa, mas necessária para o sucesso da cultura. A correlação entre os resultados dos diferentes experimentos executados até o presente fornece informações complementares, reforçando a hipótese de envolvimento do etileno na floração. Contudo, pesquisas básicas ainda precisam ser realizadas para confirmar a via de atuação do etileno no controle molecular do florescimento do cafeeiro.

Além disso, o desenvolvimento de pesquisas aplicadas é indispensável para aprimorar o entendimento acerca do uso do 1-MCP como produto tecnológico visando controlar artificialmente o florescimento do cafeeiro. Tais informações poderão estimular o desenvolvimento de estratégias, viabilizando a adoção de práticas que auxiliem o agricultor e estimulando a inovação na cadeia produtiva do café.