



KELLEN KAUANNE PIMENTA DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE microRNAs POTENCIALMENTE
RESPONSIVOS AO FITORMÔNIO ETILENO EM CAFEIEIRO**

LAVRAS-MG

2018

KELLEN KAUANNE PIMENTA DE OLIVEIRA

**Caracterização de micrornas potencialmente responsivos ao fitormônio etileno em
cafeeiro**

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

Prof. Antonio Chalfun Júnior, PhD.

Orientador

Dr^a. Christiane Noronha Fernandes Brum

Coorientadora

**LAVRAS-MG
2018**

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

Oliveira, Kellen Kauanne Pimenta de.

Caracterização de microRNAs potencialmente responsivos ao fitormônio etileno em cafeeiro / Kellen Kauanne Pimenta de Oliveira. - 2018.

52 p. : il.

Orientador(a): Antonio Chalfun Júnior.

Coorientador(a): Christiane Noronha Fernandes-Brum.

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

Bibliografia.

1. microRNA. 2. Etileno. 3. Cafeeiro. I. Júnior, Antonio Chalfun. II. Fernandes-Brum, Christiane Noronha. III. Título.

KELLEN KAUANNE PIMENTA DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE microRNAs POTENCIALMENTE RESPONSIVOS AO
FITORMÔNIO ETILENO EM CAFEIEIRO**

**CHARACTERIZATION OF POTENTIALLY microRNAs RESPONSIVES TO
ETHYLENE PHYTORMONE IN COFFEE PLANTS**

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

Aprovada em 27 de Fevereiro de 2018

Antonio Chalfun Júnior, PhD. (UFLA)
Dr^a. Christiane Noronha Fernandes Brum (UFLA)
Dr. Matheus de Souza Gomes (UFU)

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

**LAVRAS-MG
2018**

Aos meus pais Sandra e Waldemir, por sempre me apoiarem e incentivarem em todos os momentos de minha vida com carinho e amor, sendo meus maiores exemplos de honestidade e esforço.
Dedico

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

Aos meus pais Sandra e Waldemir e meus irmãos Khaius e Helder pelo apoio e amor que sempre demonstraram, e pelas palavras de incentivo nos momentos difíceis.

A todos os membros atuais e que já não fazem mais parte do Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas (LFMP), especialmente ao André, Iasminy, Carlos, Pâmela, Bruno, Rafaela, Caroline, Rafael, Luiza, Gabriela, Andressa, Gabriel, Pedro, Isadora, Luisa, Thales, Vitor e Yudai, pelo companheirismo, amizade, disposição pra ajudar durante as diversas etapas deste trabalho e por dividirem comigo seus conhecimentos, todos vocês me ajudaram a concluir este trabalho. Além de amigos, vocês se tornaram minha família...

Aos queridos Regina e Sérgio por terem me acolhido com carinho como membro de sua família.

Ao meu companheiro de vida José Diogo, por compartilhar comigo os melhores e piores momentos dessa jornada, com muita paciência, amor e carinho, muito obrigada por tudo.

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

Muito Obrigada!

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.” (Cora Coralina)

RESUMO

O café é a segunda maior commodity brasileira, com grande importância para a economia. Diversas cultivares já foram desenvolvidas, no entanto o florescimento assíncrono ainda é um problema enfrentado nessa cultura. Esta assincronia acarreta na maturação desuniforme dos frutos, gerando perdas na qualidade do produto final e na lucratividade. Sabe-se que um período de déficit hídrico seguido de reidratação estimula a antese de gemas que estão aptas a responder este estímulo, o que faz com que esta estratégia seja constantemente adotada para concentração da florada. Em algumas espécies tem se observado que o estresse hídrico seguido de reidratação aumenta os níveis de etileno. Esta constatação, levou à hipótese do envolvimento do etileno na promoção da antese em cafeeiro. A aplicação do 1-MCP (inibidor da ação do etileno) promoveu a antese em cafeeiro em condição de campo e aumentou a expressão de genes envolvidos na biossíntese do etileno. Os microRNAs estão envolvidos em diversas fases de desenvolvimento da planta, incluindo o florescimento e alguns estudos recentes relatam que eles estão envolvidos nas vias de sinalização do etileno. Com o intuito de explorar o modo como os microRNAs podem estar envolvidos no processo de floração do cafeeiro e sua relação com o etileno, objetivou-se neste trabalho, avaliar os efeitos da aplicação de 1-MCP sobre a expressão de microRNAs potencialmente responsivos a este hormônio em gemas de cafeeiro, assim como a caracterização de possíveis alvos para estas moléculas, em plantas sob diferentes condições hídricas. miR396, miR156, miR319 e miR172 foram escolhidos para a análise da expressão gênica por *stem-loop RT-PCR*, predição de alvos e análise dos termos de ontologia gênica. Nas plantas sob estresse hídrico, os quatro microRNAs foram responsivos a aplicação de 1-MCP. miR396a-5p e miR156f-3p foram reprimidos e miR319c-2-3p e miR172d-1-3p foram induzidos. Já para as plantas completamente re-irrigadas e constantemente irrigadas não houve diferença de expressão para os quatro microRNAs entre os tratamentos provavelmente porque o 1-MCP tem o mesmo efeito que a irrigação na antese do cafeeiro. A análise dos termos de ontologia gênica para os alvos preditos para cada microRNA indica que eles podem estar envolvidos nas vias de sinalização hormonal, inclusive para o etileno.

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

ABSTRACT

Coffee is the second largest commodity in Brazil, with great importance for the economy. Several cultivars have already been developed, but asynchronous flowering is still a problem in this crop. This asynchrony causes uneven maturation of the fruits, leading to losses in the quality of the final product and in profitability. It is known that a period of water deficit followed by rehydration stimulates the anthesis of buds that are able to respond to this stimulus, which means that this strategy is constantly adopted to concentrate the flowering. In some species it has been observed that water stress followed by rehydration increases ethylene levels. This finding led to the hypothesis of the involvement of ethylene in the promotion of anthesis in coffee. The application of 1-MCP (ethylene action inhibitor) promoted anthesis in coffee in field condition and increased the expression of genes involved in ethylene biosynthesis. microRNAs are involved in several stages of plant development, including flowering, and some recent studies report that they are involved in ethylene signaling pathways. In order to explore how microRNAs may be involved in the flowering process of coffee and its relation with ethylene, the objective of this work was to evaluate the effects of 1-MCP application on the expression of microRNAs potentially responsive to this hormone in coffee flower buds, as well as the characterization of possible targets for these molecules, in plants under different water conditions. miR396, miR156, miR319 and miR172 were chosen for the analysis of gene expression by stem-loop RT-PCR, target prediction and analysis of gene ontology terms. In plants under water stress, the four microRNAs were responsive to the application of 1-MCP. miR396a-5p and miR156f-3p were repressed and miR319-2-3p and miR172d-1-3p were induced. For the completely re-irrigated and constantly irrigated plants there was no difference in expression for the four microRNAs between the treatments probably because 1-MCP had the same effect as the irrigation in the anthesis of the coffee tree. The analysis of the gene ontology terms for the predicted targets for each microRNA indicates that they may be involved in the signaling pathways, including ethylene signaling.

Keywords: Coffee. microRNAs. 1-MCP. Ethylene. Anthesis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Caracterização da espécie de estudo	12
2.2	Fenologia do cafeeiro	12
2.3	Etileno e seu papel na regulação do florescimento	16
2.4	1-MCP: mecanismo de ação e aplicações	18
2.5	Florescimento: aspectos moleculares	19
2.6	Biogênese dos microRNAs	21
2.7	microRNAs no florescimento	23
3	HIPÓTESE	27
4	OBJETIVOS	28
4.1	Objetivos específicos	28
5	MATERIAL E MÉTODOS	29
5.1	Local, período experimental e material vegetal	29
5.2	Tratamentos e delineamento experimental	29
5.3	Coleta do material	30
5.4	Análise da expressão gênica	30
5.4.1	Extração de RNA e tratamento com DNase	30
5.4.2	Quantificação e análise da qualidade do RNA	31
5.4.3	Seleção dos microRNAs	31
5.4.4	Síntese de cDNA	32
5.4.5	Expressão dos microRNAs por <i>stem-loop RT-PCR</i>	33
5.5	Predição de alvos para microRNAs	34
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6.1	Análise da expressão gênica	36
6.2	Análise dos termos de Ontologia gênica para os alvos preditos dos microRNA	39
7	CONCLUSÕES	43
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se no cenário mundial como o maior produtor e exportador de café, a estimativa de colheita desta comódite para o ano de 2018, está entre 54 e 58 milhões de sacas (CONAB, 2018). Devido à importância econômica do cafeeiro para a economia brasileira e mundial, vários estudos de melhoramento genético têm sido realizados a fim de se obter variedades com características agronômicas importantes, como tolerância à estresses bióticos e abióticos e maior produtividade (TONIETTO et al., 2012).

Diversas cultivares de café já foram desenvolvidas, no entanto um dos principais problemas ainda enfrentados nessa cultura é o florescimento assincrônico, que acarreta na maturação desuniforme dos frutos, pois as floradas ocorrem em períodos distintos e com intensidades diferentes (BARROS et al., 1978; RENA; BARROS, 2004). Como resultado dessa desuniformidade, são encontrados frutos em diferentes estádios de maturação, acarretando numa piora da qualidade e perdas na cadeia produtiva do café, além do aumento no custo de produção devido a colheitas consecutivas (DIAS, 2013; PEREIRA et al., 2005).

Dentre os fatores ambientais que influenciam no florescimento do cafeeiro, sabe-se que um período de déficit hídrico seguido de reidratação estimula a antese de gemas que estão aptas a responder este estímulo, o que faz com que esta estratégia seja constantemente adotada para concentração da florada (ALVIM, 1960; GUERRA et al., 2005; RENA; MAESTRI, 1986; CRISOSTO, 1992; RONCHI et al., 2015). Crisosto et al., (1992) sugeriram que mudanças de sinalização química da raiz para parte aérea causadas por mensageiros químicos, como os fitormônios, sejam capazes de tornar os botões florais aptos para a antese, estimulando a floração. No entanto, ainda são escassos os estudos sobre os mecanismos que atuam neste processo.

Lima (2015), sugeriu que existe uma provável influência do fitormônio etileno na indução da antese no cafeeiro. Sua hipótese indica que uma molécula precursora do etileno, o Ácido Aminociclopropano Carboxílico (ACC), seria produzida na raiz do cafeeiro durante o período de seca e depois transportada para a parte aérea após reidratação da planta. Na parte aérea, o ACC seria então convertido a etileno e a elevação rápida e transitória nos níveis deste hormônio seria um dos sinais envolvidos na promoção da antese do cafeeiro.

Em seu experimento, Lima (2015) aplicou o 1-metilciclopropeno (1-MCP), um inibidor da ação do etileno, esperando que a antese não ocorresse. No entanto, a resposta observada foi o contrário, sendo verificada antese apenas nas plantas tratadas com 1-MCP. Com objetivo de melhor compreender o modo como o etileno regula o florescimento do

cafeeiro, Santos (2016) também fez uso da aplicação exógena de 1-MCP em cafeeiro e verificou que há um provável aumento dos níveis de etileno nas gemas de forma rápida e transitória.

Muitos mecanismos moleculares que regulam as diversas fases de desenvolvimento das plantas são conhecidos, no entanto ainda há muito a ser elucidado. Os pequenos RNAs (sRNA) por exemplo, começaram a ser melhor compreendidos há menos de duas décadas. Dentre estas moléculas, destacam-se os microRNAs, que atuam como reguladores da expressão gênica. Estas moléculas foram descobertas inicialmente em *Caenorhabditis elegans* (LEE et al., 1993), mas já foram identificadas em diferentes espécies de animais e plantas (ARTEAGA-VÁSQUEZ et al., 2006).

Em plantas, os microRNAs têm um papel importante sobre os genes envolvidos na complexa rede de regulação do desenvolvimento floral, mais especificamente, na regulação de genes de identidade floral, no desenvolvimento de órgãos sexuais e no tempo de florescimento (WANG et al., 2009; ACHARD et al., 2004).

Muitos estudos têm demonstrado que os pequenos RNAs também estão envolvidos na regulação da transdução de sinal de vários fitormônios, incluindo o etileno (PILCHER et al., 2007; MOXON et al., 2008; ZHANG et al., 2011; ZUO et al., 2012). Com auxílio do sequenciamento em larga escala, vários microRNAs responsivos a este fitormônio já foram identificados em diversas espécies, como tomate (WANG et al., 2017), arroz (LIU et al., 2009), rosas (PEI et al., 2013), *Medicago truncatula* (CHEN et al., 2012) e cevada (BAI et al., 2017).

Com o intuito de explorar o modo como os microRNAs possam estar envolvidos no processo de floração do cafeeiro e sua relação com o etileno, objetivou-se neste trabalho, avaliar os efeitos da aplicação de 1-MCP sobre a expressão de microRNAs potencialmente responsivos ao etileno em gemas de cafeeiro, assim como caracterizar possíveis alvos destas moléculas, em plantas sob diferentes condições hídricas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caracterização da espécie de estudo

O cafeeiro pertence à família Rubiaceae, gênero *Coffea* L., com 103 espécies descritas, sendo a grande maioria diploide e alogâmica (DAVIS et al., 2006), porém, apenas *C. arabica* (café Arábica), *C. canephora* (café Robusta\Conilon), *C. liberica* (café Libérica), e *C. dewevrei* (café Excelsa) são cultivados. Destes, apenas duas possuem importância econômica: *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. No Brasil, 80% da produção total é de *C. arabica* (CONAB, 2018).

A espécie *C. arabica* teve sua origem nas regiões do sudoeste da Etiópia, sudeste do Sudão e norte do Quênia, numa faixa de altitude variando de 1.000 a 2.000 metros (DAVIS et al., 2006; GUERREIRO-FILHO et al., 2008), a partir da hibridação natural de gametas não reduzidos das espécies diplóides, *C. eugenoides* e *C. canephora* (LASHERMES et al., 1999; SAKIYAMA et al., 1999). Portanto, é uma espécie alotetraploide ($2n=4x=44$) e considerada autógama quanto à sua reprodução, com cerca de 90% das suas flores fertilizadas com gametas da mesma planta e apenas 10% de polinização cruzada (AGUIAR et al., 2004).

O café Arábica chegou ao Brasil em 1727, com introdução de semente de três plantas, sendo assim, sua base genética é bastante estreita e todas as cultivares disponíveis da espécie são provenientes das duas formas botânicas, *Typica* e *Bourbon*. Apesar disso, *C. arabica* apresenta cultivares com grande variabilidade devido a fatores como cruzamentos, mutações, práticas agrônomicas e o ambiente (GUERREIRO-FILHO et al., 2008; ANTHONY et al., 2001).

2.2 Fenologia do cafeeiro

Ao contrário da maioria das angiospermas, que emitem inflorescências e frutificam no mesmo ano fenológico, o café precisa de dois anos para completar seu ciclo (CAMARGO; CAMARGO, 2001). O primeiro ano se inicia com crescimento vegetativo caracterizado pelo desenvolvimento dos ramos plagiotrópicos a partir dos ramos ortotrópicos. A primeira fase, que compreende os meses de setembro a março, tem início a partir da formação das gemas axilares nos nós dos ramos plagiotrópicos primários (CAMARGO; CAMARGO, 2001; LIVRAMENTO, 2010; RENA; MAESTRI, 1986).

Entre janeiro e fevereiro, começa a diferenciação das gemas florais, que iniciam seu desenvolvimento. Cada axila da folha tem quatro a cinco botões, que estão em diferentes

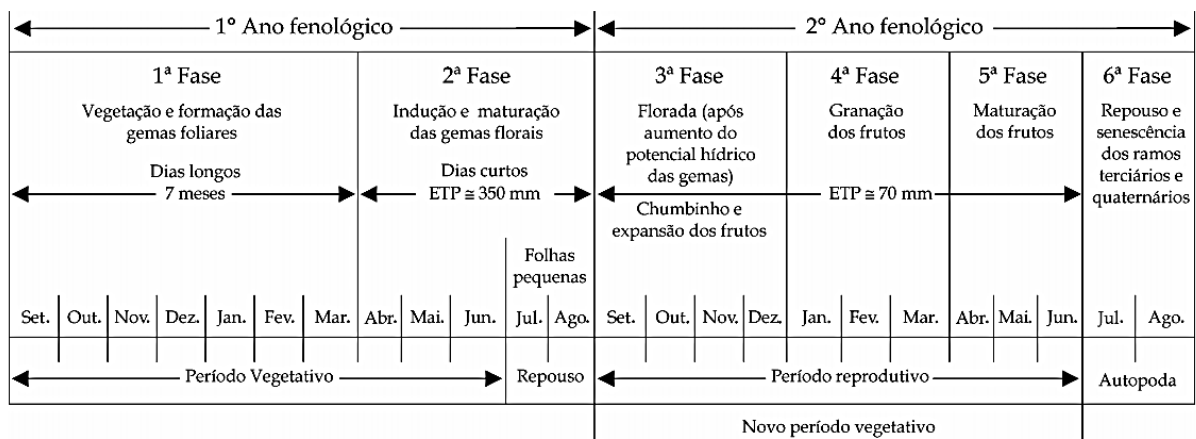
estádios de desenvolvimento desde a sua criação (MAJEROWICZ; SONDAHL, 2005; DE OLIVEIRA et al., 2014). Após a indução, quatro meristemas florais são formados dentro de cada botão e seu desenvolvimento também é assíncrono (DE OLIVEIRA et al., 2014).

Quando as gemas florais atingem a maturação, momento em que todos os verticilos florais já estão formados (DE OLIVEIRA et al., 2014), entram em estágio de dormência, que corresponde aos meses de inverno, quando o potencial hídrico diminui. As gemas florais permanecem nesse estágio de dormência até que ocorra o choque hídrico. Esse choque hídrico, causado por chuva ou irrigação é o principal fator para desencadear a florada, mas o aumento da umidade relativa do ar, pode também iniciar este processo (CAMARGO; FRANCO, 1985).

O segundo ano fenológico inicia-se com a florada seguida pela formação dos chumbinhos, que precede a expansão dos grãos até atingir o tamanho normal. Em seguida ocorre a granação dos frutos e a fase de maturação. Por fim, ocorre a senescência, morte dos ramos plagiotrópicos terminais (auto-poda). Na primavera do próximo ano, brotam novos ramos vegetativos, que se transformam em reprodutivos, permitindo nova produção (CAMARGO; CAMARGO, 2001).

Camargo e Camargo (2001) propuseram um esquema dividido em seis fases para a fenologia do cafeeiro Arábica (FIGURA 1): 1) vegetação e gemas foliares; 2) indução e maturação das gemas florais; 3) florada; 4) granação dos frutos; 5) maturação dos frutos; 6) repouso e senescência dos ramos terciários e quaternários.

Figura 1 – Fases fenológicas do cafeeiro Arábica nas condições climáticas do Brasil.



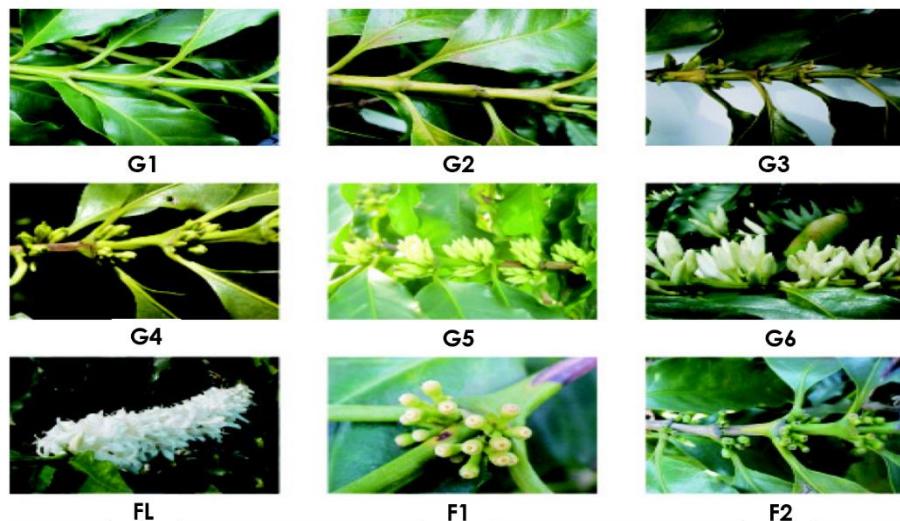
Fonte: Camargo; Camargo (2001).

Dando ênfase à fase reprodutiva, Morais et al. (2008) dividiram o desenvolvimento reprodutivo do cafeeiro (Figura 2) em quatro grandes fases: desenvolvimento da gema floral

(G), floração (FL), frutificação (F) e maturação (M), as quais são denominadas com suas letras iniciais (FIGURA 2).

A fase G foi subdividida de acordo com o tamanho das gemas, sendo G1 – nós com gemas indiferenciadas; G2 – nós com gemas intumescidas; G3 – gemas com até 3 mm de comprimento; G4 – gemas medindo 3,1 a 6 mm de comprimento (fase de maturação, em que todos os verticilos florais já estão desenvolvidos e as gemas entram em dormência); G5 – gemas de 6,1 a 10 mm (coloração verde claro). No estágio G6 (gema maior que 10 mm e coloração branca), ocorre a abertura das flores (FL) logo nas primeiras horas da manhã, as quais murcham no segundo dia e caem no terceiro. A fase F foi subdividida de acordo com o tamanho dos frutos e a fase M de acordo com a coloração dos frutos. Cada fase do desenvolvimento é acompanhada por alterações morfológicas, anatômicas e bioquímicas, sendo sua duração variável e decorrente de fatores ambientais (chuva, temperatura e fotoperíodo) e atributos endógenos (genótipo, crescimento vegetativo, potencial produtivo estado nutricional e reguladores de crescimento) (MORAIS et al. 2008).

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



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

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

O florescimento sequencial em cafeeiro, acarreta na maturação desuniforme dos frutos. É possível observar durante o período do outono-inverno, frutos maduros, frutos verdes grandes e pequenos e flores em diferentes estádios de desenvolvimento em uma mesma árvore ou ramo, e várias destas etapas podem ocorrer em um único nó. Essa assincronia dificulta e aumenta os custos da colheita, e diminui a qualidade do produto final,

gerando perdas na lucratividade (VOLTAN et al., 2011; CRISOSTO et al., 1992; MAJEROWICZ; SÖNDAHL, 2005).

Nota-se que quando ocorre um déficit hídrico um pouco mais acentuado no período de dormência das gemas (fase G4), a florada principal é bem definida, diminuindo a desuniformidade (RENA; MAESTRI, 1986). Entretanto, um certo nível de desenvolvimento das gemas é requerido para que o choque hídrico tenha efeito sobre a floração, ou seja, gemas maduras com crescimento secundário dos vasos condutores, o que permite a resposta à irrigação (CRISOSTO et al., 1992). Seria necessário que todas as gemas atingissem o estágio ideal antes do repouso e que após as chuvas as flores abrissem ao mesmo tempo, para que houvesse maior sincronia (VOLTAN et al., 2011).

O retorno das chuvas, ou irrigação, promovem o aumento substancial no teor de água das gemas dormentes, fazendo com que elas retomem seu crescimento, este processo resulta da absorção de água pelas folhas, desencadeando um rápido influxo para os botões florais (ALVIM, 1973; BROWNING, 1977; MAGALHÃES; ANGELOCCI, 1976). No entanto, somente as gemas dormentes que se encontram no estágio G4, estão aptas a responder a este estímulo e esta capacidade provavelmente está relacionada com o desenvolvimento de um feixe vascular contendo xilema secundário (CRISOSTO et al., 1992). Gemas em fases anteriores a G4 apresentam pouca quantidade de pequenos elementos do xilema primário, e essa restrição anatômica limita a comunicação dessas gemas com estímulos emitidos pela raiz durante ou após um período de déficit hídrico (ALVIM, 1960; CRISOSTO et al., 1992).

Embora o ácido abscísico (ABA) seja geralmente considerado como a principal molécula de sinalização hormonal para as plantas em resposta ao estresse hídrico (SEKI et al., 2007), alguns estudos mostram que o etileno também pode desempenhar um papel importante neste processo biológico (WILKINSON; DAVIES, 2010; LIU et al., 2013). Em algumas espécies, a desidratação pode resultar na produção de etileno em alguns órgãos, como nos pecíolos de algodão (GUINN, 1976) e nas folhas de trigo (MCKEON et al., 1982), já nas mudas de *Citrus reshni*, observa-se um aumento rápido e substancial na produção de etileno nas folhas de plantas estressadas após a reidratação, resultando em abscisão foliar (TUDELA; PRIMO-MILLO, 1992).

Em cafeeiro, Lima (2015) baseado na hipótese de que o etileno seria um indutor da antese, fez uso da aplicação de 1-Metilciclopropeno (1-MCP) com objetivo de inibir este processo, no entanto, o produto atuou como um indutor. A análise da expressão de genes relacionados com a biossíntese do etileno, mostrou que a aplicação do 1-MCP promoveu um

aumento rápido na expressão destes genes após 2h das pulverizações, mas o tempo de duração parece não exceder 24 horas (LIMA 2015; SANTOS, 2016).

2.3 Etileno e seu papel na regulação do florescimento

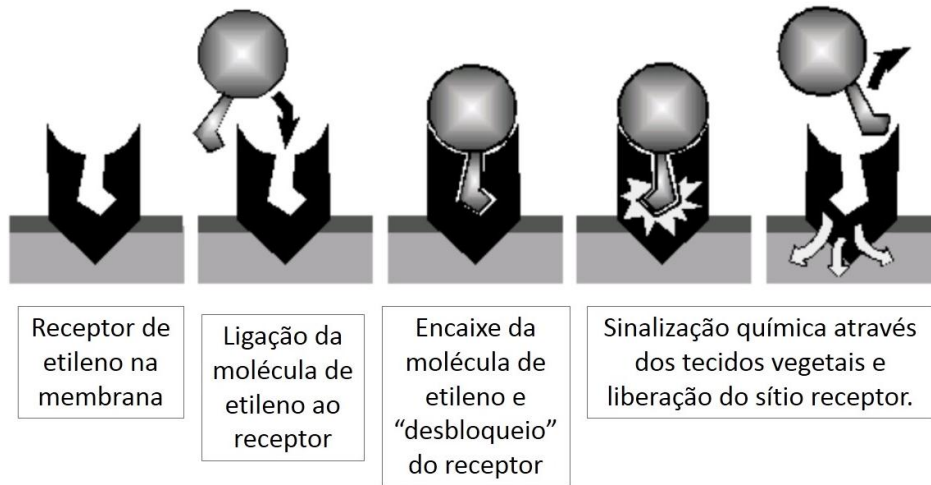
O etileno C_2H_4 é um hormônio gasoso, que atua como regulador endógeno do crescimento e desenvolvimento em plantas superiores. Dentre os processos mais bem estudados em que esse hormônio atua, estão a germinação de sementes, crescimento de plântulas, amadurecimento de frutos, senescência de flores e folhas, abscisão foliar e desenvolvimento do pêlo radicular (ABELES et al., 1992; GRBIĆ; BLEECKER, 1995; JOHNSON; ECKER, 1998; CHEN; ETHERIDGE; SCHALLER, 2005).

Além de participar das diversas etapas de desenvolvimento das plantas, o etileno também é conhecido como o hormônio do estresse, por ter sua síntese promovida por diversos sinais, como ferimentos mecânicos (herbivoria, infecção por patógenos), estresse hídrico, salino, térmico, substâncias químicas e também por outros fitormônios (FAGAN et al., 2015; SCHRODER et al., 2007; WANG et al., 2002; KENDE, 1993).

O etileno pode ser produzido por quase todas as partes das plantas superiores, sendo derivado do aminoácido metionina e do intermediário S-adenosilmetionina, que é gerado no ciclo de Yang. O início da biossíntese do etileno se dá pela conversão de S-adenosilmetionina em ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) pela enzima ACC-sintase (ACS). Por fim, o ACC é convertido em etileno pelas enzimas denominadas ACC-oxidases (ACO) (MCKEON et al., 1995).

Em *A. thaliana*, a via de sinalização de etileno foi bem caracterizada, de forma sintética, o etileno é percebido por uma família de receptores localizados nas membranas celulares com auxílio do co-fator cobre (FIGURA 4). Estes receptores então ativam a CTR1, uma proteína quinase, que atua como um regulador negativo das respostas do etileno. CTR1 passa então o sinal para *ETHYLENE INSENSITIVE2 (EIN2)*, uma proteína transmembranar, através de uma série de cascatas MAPK e em seguida, para *EIN3/EILs*, fatores de transcrição que desencadeiam a expressão de genes alvo a jusante, como *Ethylene Responsive Factor1 (ERF1)* (SOLANO et al., 1998; et al., 2013).

Figura 4 – Ligação das moléculas de etileno aos receptores associados às membranas.



Fonte: adaptado de Blankenship (2001)

Já em relação ao florescimento, o papel do etileno ainda não é bem elucidado, pois o mesmo varia entre espécies. Em lírio (HAN, et al. 1990), bromélia (DUKOVSKI; BERNATZKY; HAN, 2006), cravo (JONES; WOODSON, 1997) e petúnia (TANG; WOODSON, 1996) o etileno induziu a floração. Em abacaxi, a aplicação de etileno ou compostos liberadores de etileno é adotada constantemente como estratégia para uniformizar o florescimento e frutificação (COOKE; RANDALL, 1968; BARTHOLOMEW, 1977; TURNBULL et al., 1999; ESPINOSA et al., 2017).

Por outro lado, a aplicação de etileno inibiu completamente a floração em *Pharbitis nil* quando feita durante indução por fotoperíodo (SUGE, 1972). Já a abertura das flores em rosas é sensível ao etileno, embora o grau dessa sensibilidade varie em diferentes cultivares (REID et al., 1989; YAMAMOTO et al., 1994; MÜLLER et al., 2001; TAN et al., 2006).

Em *A. thaliana* o etileno atrasa a floração e esse atraso é parcialmente resgatado por mutações de perda-de-função em genes *DELLA*, uma família de proteínas que atuam reprimindo as respostas a Giberelinas (GAs). Neste caso, a sinalização do etileno reduziu os níveis de GAs ativas, aumentando assim a acumulação de DELLAs. A acumulação de DELLA por sua vez, atrasou a floração através da repressão dos genes de identidade do meristema floral, *LEAFY (LFY)* e *SUPPRESSOR DE OVEREXPRESSION DE CONSTANS 1 (SOC1)* (ACHARD et al., 2003).

Proteínas DELLAs são repressoras da ação de GAs e estão ativas na ausência desse hormônio, atuando como um regulador negativo da sinalização através do bloqueio da expressão dos genes induzidos pelas GAs. Quando ocorre a ligação de GA ao receptor, as proteínas DELLA são degradadas permitindo a expressão dos genes induzidos por GAs (CAO

et al., 2006; FUKAZAWA et al., 2014; YU et al., 2012;). A ativação do gene *LFY* por GA é mediada pelo fator de transcrição *GAMYB-like*, que é regulado negativamente pelas proteínas DELLA. Os níveis de transcrição de *GAMYB-like* são modulados pelo miR159 (GOCAL et al. 2001; ACHARD et al., 2004; CSUKASI et al., 2012; MILLAR; GUBLER, 2005)

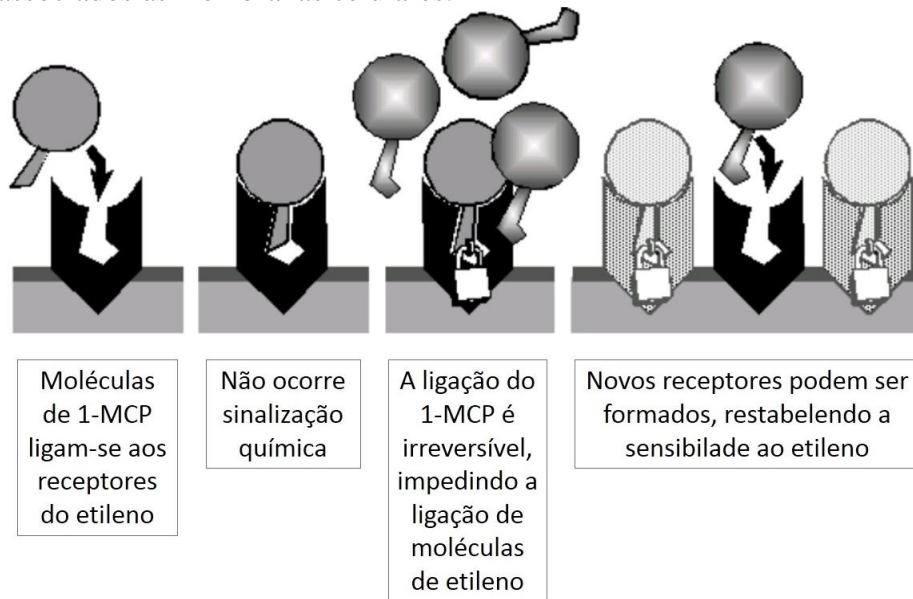
2.4 1-MCP: mecanismo de ação e aplicações

O metilciclopropeno (1-MCP) é um gás volátil inodoro com fórmula química C_4H_6 , classificado como ciclopropeno. O 1-MCP é constantemente utilizado como um regulador sintético do crescimento vegetal, é considerado estável à temperatura ambiente e tem um modo de ação não tóxico. Até agora é o mais promissor inibidor da ação do etileno (VAN STADEN, 1979; BURNS, 2008).

Devido ao seu mecanismo de ação, o 1-MCP se tornou uma ferramenta muito útil para diminuir os efeitos indesejáveis do etileno na agricultura. Em particular, os efeitos fisiológicos pós-colheita relacionados com o etileno na abscisão de frutos climatéricos, folhas e flores, floricultura e decomposição de frutas, foram reduzidos pela aplicação de 1-MCP (BLANKENSHIP; DOLE, 2003; WATKINS, 2006; SISLER, 2006).

O 1-MCP inibe a ação do etileno por se ligar de forma competitiva aos receptores de etileno nas membranas celulares com uma afinidade de ligação dez vezes maior (FIGURA 5). A ligação do 1-MCP aos sítios receptores do etileno é permanente, bloqueando a ligação do etileno, silenciando as respostas ao mesmo. No entanto, novos receptores podem ser sintetizados, acarretando na retomada da sensibilidade da planta ao etileno (BLANKENSHIP, 2001; BLANKENSHIP; DOLE, 2003; HALL et al., 2000; SISLER, 2006).

Figura 5 – Ligação competitiva do 1-metilciclopropeno (1-MCP) aos receptores de etileno associados às membranas celulares.



Fonte: adaptado de Blankenship (2001).

A eficácia do 1-MCP ocorre sobre baixas concentrações, pois sua meia vida de difusão está entre sete e doze dias, mas sua ação efetiva pode variar de acordo com a espécie ou a cultivar. De modo geral, a concentração do produto utilizado deve ser suficiente para saturar os receptores e evitar a ligação do etileno (BLANKENSHIP; DOLE, 2003; VILAS BOAS, 2002).

2.5 Florescimento: aspectos moleculares

O florescimento marca a transição da fase vegetativa para a reprodutiva e é definido por modificações morfofisiológicas reguladas pela interação de fatores endógenos e exógenos. Diferentes rotas já foram identificadas e relacionadas com a regulação do florescimento, sendo luz e temperatura (fotoperíodo e vernalização) rotas exógenas, e a via autônoma, a idade da planta e a regulação hormonal via Giberelina (GA) rotas endógenas (SRIKANTH; SCHMID, 2011; POSE et al., 2012).

Cada um desses sinais é percebido por complexas redes de sinalização inter-relacionadas, formando uma rede reguladora integrada que coordena a atividade gênica. De um modo geral, os sinais originados por cada uma das rotas são integrados e conduzem à conversão do meristema apical para o meristema de inflorescência e subsequente formação de flores (O'MAOILEIDIGH et al., 2014).

Um dos genes envolvidos na via de percepção do fotoperíodo é o *FLOWERING LOCUS T (FT)*, que juntamente com outros genes, por exemplo *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)*, *FLOWERING D (FD)* e *AGAMOUS-LIKE 24 (AGL24)*, formam complexos proteicos e promovem direta ou indiretamente a expressão dos genes de identidade floral (POSE et al., 2012; YAMAGUCHI; ABE, 2012). A integração dos sinais de florescimento é fortemente controlada por um complexo repressor que consiste em dois fatores de transcrição da família MADS-box, *FLOWERING LOCUS C (FLC)* e *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* (LIU; THONG; YU, 2009).

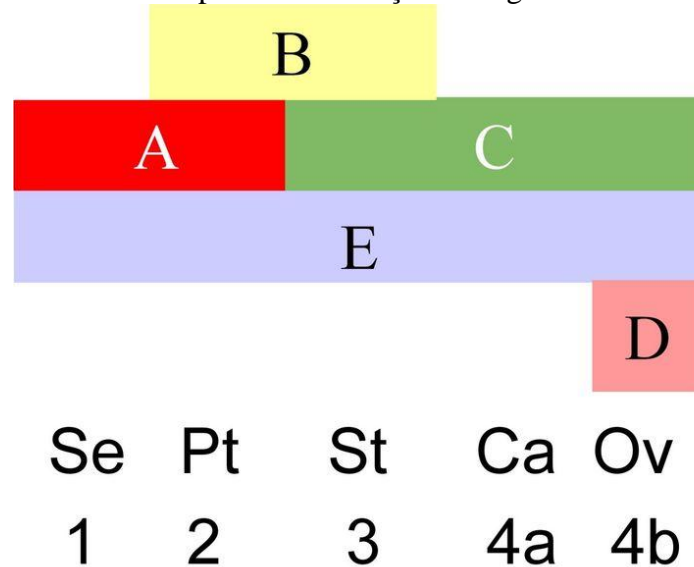
Em *Arabidopsis thaliana*, a proteína *APETALA1 (API)* do domínio MADS-box e o Fator de transcrição *LEAFY (LFY)* são reguladores mestres que controlam a identidade do meristema floral (LOHMANN; WEIGEL, 2002). A ativação de *LFY* e *API* em resposta a sinais indutivos florais envolve várias proteínas de domínio MADS-box, incluindo *SOC1*, *FRUITFULL (FUL)* e *AGL24* (LEE et al., 2008; LI et al., 2008; LIU et al., 2007; MICHAELS et al., 2003). Estudos genéticos e de expressão mostraram que *SOC1*, *FUL* e *AGL24* funcionam a jusante de *CONSTANS (CO)*, a saída da via do fotoperíodo, que acelera a floração de *A. thaliana* em dias longos (BORNER et al., 2000; LEE et al., 2000; MELZER et al., 2008).

O *CO* está conectado aos genes MADS-box através da ativação do *FT*, que integra informações de várias vias de sinalização positivas e de ação negativa. Vários estudos mostram que a proteína *FT* é um sinal de longa distância que se move diretamente das folhas para o meristema apical, atuando como um florígeno (BÄURLE, DEAN, 2006, KOBAYASHI; WEIGEL, 2007; TURCK et al., 2008). O *FT* executa seu papel através da interação com o fator de transcrição *FD*, que é expresso especificamente no meristema apical, onde o complexo *FT/FD* ativa vários genes MADS-box (ABE et al., 2005; WIGGE et al., 2005). Como *FT* nas folhas, *FD* no meristema apical é um alvo direto do potente repressor *FLC*, que medeia os efeitos da vernalização. O *FLC* forma um complexo com outra proteína de domínio MADS-box, *SVP*, e em conjunto, reprimem não apenas *FT*, mas também *SOC1* (SEARLE et al., 2006; LEE et al., 2007; LI et al., 2008).

Para os genes de identidade floral, foi proposto um modelo de organização denominado ABCDE (COEN et al., 1991). Os genes de classe A, *APETALA1 (API)* e *APETALA2 (AP2)*, determinam as sépalas, os da classe B, incluem dois genes *PISTILLATA (PI)* e *APETALA3 (AP3)*, são necessários para a formação de pétalas, o da classe C, *AGAMOUS (AG)*, determinam os carpelos, e a interação das classes B e C formam os estames. Os genes da classe E compreendem os *SEPALLATA1-3 (SEPI-3)* e junto com os

genes ABC, formam tetrâmeros de combinações ABCE, que se ligam ao DNA e determinam os órgãos florais. Já os genes da classe D, como *SEEDSTICK (STK)* e *FLORAL-BINDING PROTEIN (FBP)*, somados aos da classe C e E, são necessários para o desenvolvimento normal do óvulo (WEIGEL et al. 1992; THEIBEN, 2011; VAN MOURIK et al., 2010; SU et al., 2013).

Figura 6 – O modelo ABCDE para determinação de órgãos florais em *Arabidopsis thaliana*.



Legenda: A Figura 6 mostra os domínios de expressão das cinco classes de genes correspondentes aos quatro tipos de órgãos florais: sépalas (Se), pétalas (Pt), estames (St) e (Ca), incluindo óvulos (Ov) (Os dois últimos são considerados um único órgão para facilitar a compreensão). A figura deve ser lida em coluna, por exemplo, na espiral Se 1, os genes A e E são predominantemente expressos. A identidade de Se é determinada pela expressão (alta) dos genes do tipo A e E, e isso normalmente ocorre no verticilo 1, a espiral mais externa do meristema floral.

Fonte: adaptado de Van Mourik. (2010).

2.6 Biogênese dos microRNAs

Grande parte das sequências transcritas de um genoma não codificam proteínas e são chamadas de RNAs não-codantes (ncRNAs). Dentre os RNAs não codantes, há um grupo de pequenos RNAs (sRNAs) que atuam no silenciamento mediado por RNA, controlando a expressão de muitos genes. Apesar destes pequenos RNAs serem bioquimicamente muito próximos, eles diferem entre si do ponto de vista funcional e em sua biogênese, por exemplo, os microRNAs são transcritos a partir de genes MIR, enquanto os pequenos RNAs são produtos da clivagem de outros RNAs (VOINNET, 2009; ZHAO et al., 2016; WANG; CHEKANOVA, 2016).

Os microRNA são uma extensa classe de pequenos RNA endógenas, não codantes, que variam entre 20 e 24 nucleotídeos de comprimento e estão envolvidos na mediação e

silenciamento da expressão gênica pós-transcricional. Apesar da inibição da tradução por clivagem ser um processo classicamente mediado por pequenos RNAs de interferência (siRNAs), microRNAs também exercem esse papel (VOINNET, 2009; BUDAK; AKPINAR, 2015).

Os genes MIR geralmente codificam uma unidade de transcrição e são transcritos pela RNA polimerase II (POL II). Os transcritos miRNA primários (pri-miRNA) são 5'-capsulados e poliadenilados e são capazes de formar estruturas de dobra imperfeitas denominadas “*hairpins*”, que possuem um braço 5p e um 3p, com tamanho semelhante aos transcritos que codificam proteínas (TANG, 2010; BUDAK; AKPINAR, 2015).

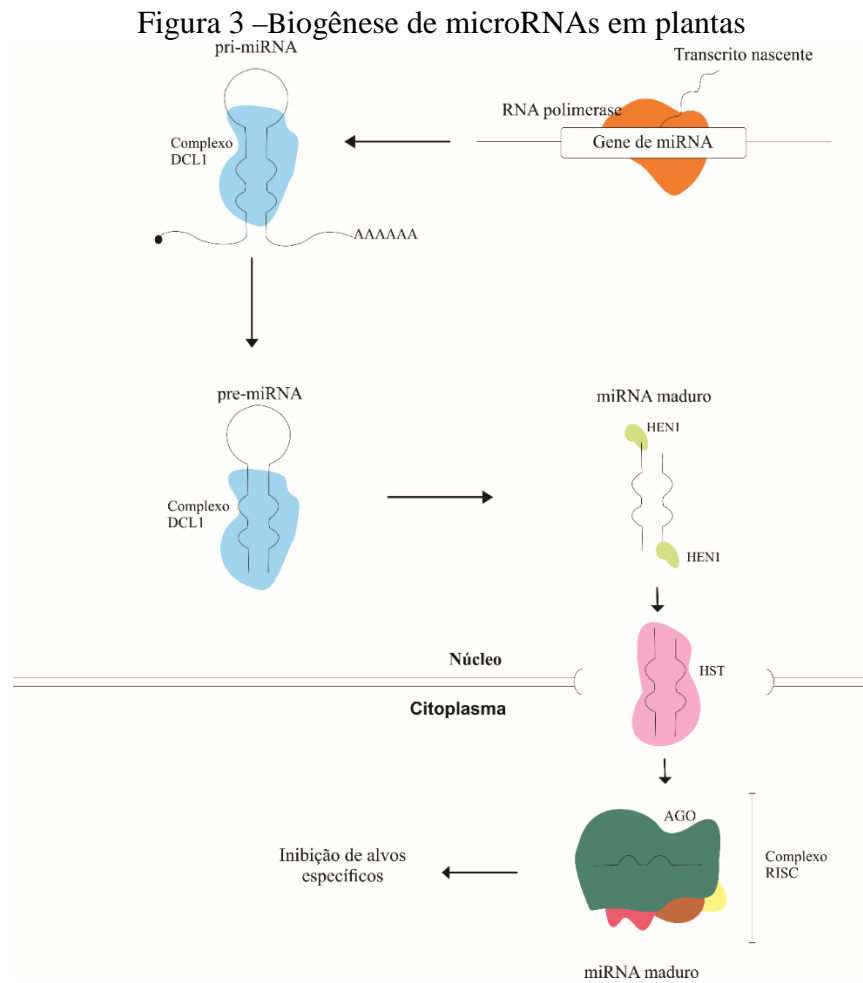
Embora os genes MIR frequentemente codifiquem um transcrito de RNA único, existem alguns microRNAs policistrônicos documentados em plantas, um fenômeno que é muito mais comum em animais. A transcrição de alguns *loci* de microRNAs podem gerar transcritos com estruturas e sequências de “*hairpin*” diferentes, mas que ainda podem ser processadas pela maquinaria de biogênese dos microRNAs, resultando em sequências “maduras” diferentes (VOINNET, 2009; AXTELL et al., 2011, BUDAK; AKPINAR, 2015)

Em plantas, o transcrito primário (pri-miRNA) é estabilizado pelas proteínas de ligação DAWDLE (DDL), sendo processado ainda no núcleo pela atividade endonuclease de DICER-LIKE1 (DCL1) com auxílio de outras proteínas, como as proteínas de ligação a RNA dupla fita (dsRNA) HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) e SERRATE (SE) em precursores (pré-miRNAs) (DONG; HAN; FEDOROFF, 2008; KURIHARA et al., 2006). Em seguida, os pré-miRNAs sofrem uma clivagem subsequente pelo complexo DCL, formando uma estrutura de duplex (MARGIS et al., 2006).

O pré-miRNA em plantas varia de 49 a 900 nucleotídeos de comprimento e sofre processamento por DCL1, ou, alternativamente, por DCL2, DCL3 e DCL4, formando um duplex com dois nucleotídeos 3' projetados lateralmente (MARGIS et al., 2006). Os microRNAs possuem em geral 21 nucleotídeos, mas o tamanho varia dependendo da DCL que faz a clivagem. A distância entre os domínios RNase III e PAZ é sugerida como sendo determinante no comprimento do microRNA (BOLOGNA, VOINNET, 2014; ROGERS; CHEN, 2013; BUDAK; AKPINAR, 2015).

O duplex é então metilado na extremidade 3' por uma metiltransferase, denominada HUA ENCHANCER1 (HEN1), para evitar modificações posteriores e a degradação por exonucleases (RAMACHANDRAN; CHEN, 2008). A proteína HASTY (HST) realiza o transporte do duplex para o citoplasma (PARK et al., 2005), onde um dos braços do duplex é escolhido e incorporado a uma proteína da família ARGONAUTA (AGO) para formar o

sistema RISC (*RNA Induced Silencing Complex*). Um dos domínios da proteína AGO, denominado PIWI possui atividade de endonuclease, capaz de clivar os alvos dos microRNAs (PARK et al., 2005; ROGERS; CHEN, 2013; CARTHEW; SONTHEIMER, 2009; DEBAT, DUCASSE, 2014). A Figura 3 ilustra o processo de biogênese e maturação de microRNAs em plantas.



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

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

2.7 microRNAs no florescimento

Os microRNAs atuam em diversas fases do desenvolvimento das plantas, inclusive no florescimento, na regulação do tempo do florescimento e de muitos genes importantes que atuam na formação e desenvolvimento de órgãos florais (AUKERMAN; SAKAI, 2003; PARK et al., 2005; ACHARD et al., 2004). Dentre as famílias de microRNAs conservadas

em plantas, as duas mais bem estudadas são a miR172 e miR156, que atuam na transição da fase juvenil para a fase adulta.

O miR156, possui como alvos alguns genes que pertencem a família de fatores de transcrição do tipo *SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE PROTEINS (SPLs)* (WANG et al., 2009). Estes genes são específicos de plantas e estão envolvidos da transição da fase juvenil, para a fase adulta. A expressão deste microRNA é maior durante a fase juvenil e vai diminuindo à medida que a planta se desenvolve, promovendo a mudança de fase. Experimentos em plantas que super expressavam este microRNA, mostraram que as mesmas permaneciam mais tempo na fase juvenil e apresentaram atraso no florescimento (CHUCK et al., 2007; WANG et al., 2011; SILVA et al., 2014).

O miR172 tem como alvos os fatores de transcrição da família *APETALA2-like (AP2-like)*, que são conhecidos como repressores florais e pertencem a classe A de genes de identidade floral. Experimentos com plantas mutantes, em que a expressão deste microRNA foi aumentada, apresentavam florescimento precoce (OKAMURO et al., 1997; AUKERMAN; SAKAI, 2003; CHEN et al., 2004).

A expressão do miR172 é oposta ao miR156, pois os fatores transcricionais *SPL9* e *SPL10* (alvos do miR156) atuam como ativadores da expressão do miR172. Dessa forma, quando a expressão do miR156 é reduzida, a expressão do miR172 aumenta. Enquanto miR156 é encontrado nos primeiros estádios de desenvolvimento e reduz ao longo do desenvolvimento, miR172 é encontrado nos estádios mais avançados, principalmente em folhas e botões florais. miR172 também atua nas rotas de temperatura e fotoperíodo (AUKERMAN; SAKAI, 2003, YAMAGUCHI; ABE, 2012; KIM et al., 2006).

O miR396 é um dos microRNAs conservados que desempenha papéis importantes no desenvolvimento das plantas, regulando a expressão dos Fatores Reguladores do Crescimento (*GRFs*), uma classe de fatores de transcrição (DEBERNARDI et al., 2012). A rede miR396/*GRF* é o ponto de controle central na regulação de vários processos de desenvolvimento de plantas, incluindo desenvolvimento de raízes, formação de sementes e organogênese floral (OMIDBAKHSHFARD et al., 2015).

Além disso, alguns dos membros da família miR396 foram relatados por estarem envolvidos em respostas ao estresse abiótico em *A. thaliana* e muitas outras espécies de plantas (LIU et al., 2008, ZHOU et al., 2010, GIACOMELLI et al., 2012). Yang e Yu (2009), observaram que o acúmulo deste microRNA foi induzido pela seca em plantas de tabaco e plantas transgênicas superexpressando este microRNA apresentaram melhor tolerância à seca,

com capacidade de conservação da água através da redução da área foliar e do índice estomático.

Yang e colaboradores (2015), identificaram um miR396, que tem como alvo um fator de transcrição do domínio MADS-box, *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)*, por meio do impedimento da tradução. Em *A. thaliana*, o *SVP* funciona como um regulador negativo do desenvolvimento floral como parte de um complexo com *FLC* para controlar o tempo de floração regulando negativamente o *FT* e *SOCI* se ligando diretamente a suas sequências promotoras (LEE et al., 2007; LI et al., 2008; JANG et al., 2009; IRISH, 2010). Além disso, o *SVP* também interage com outros componentes, como *API* e *AGL24*, durante os estádios 1 e 2 do desenvolvimento de flores para reprimir genes homeóticos florais que controlam a pétala, o estame e a identidade do carpelo (GREGIS et al., 2009).

Outra via de regulação da expressão gênica por microRNA, é a via miR159-*GAMYB-like*, os genes *GAMYB-like* também codificam fatores de transcrição e atuam na rota do florescimento via GAs, promovendo o *LFY*. Plantas mutantes que super expressaram o gene *MIR159a* apresentaram atraso no florescimento, pois miR159 regula os transcritos do gene *MYB33*, reduzindo sua expressão e conseqüentemente a atividade do gene *LEAFY*, que é extremamente importante no florescimento, pois este age controlando a identidade do meristema floral (WEIGEL et al., 1992). A via miR159/*GAMYB-like* também atua no desenvolvimento das anteras e no receptáculo floral (ACHARD et al., 2004; CSUKASI et al., 2012; MILLAR; GUBLER, 2005).

Outra forma de regulação da expressão gênica se dá por meio da interação entre vias reguladas por microRNAs durante o desenvolvimento floral, como é o caso das vias miR159/*GAMYB-like* e miR319/*TCP* que podem regular a via miR167/*ARF* de forma independente. O miR167 regula positivamente os Fatores de Resposta a Auxina *ARF6* e *ARF8*, que atuam na formação de órgãos florais, e sua expressão depende dos alvos de miR159 e miR319. Estes alvos de miR159 e miR319 atuam na indução da expressão do miR167 (RUBIO-SOMOZA; WEIGEL, 2013; WU et al., 2006). Além disso, os fatores de transcrição *TCP*, alvos do miR319, podem integrar sinais hormonais, ambientais e de desenvolvimento para modular vários processos biológicos (LI, 2015).

Em cafeeiro, já foram identificados e caracterizados 235 precursores e 317 microRNAs maduros, pertencentes a 113 famílias MIR, incluindo miR172 e miR156 (FERNANDES-BRUM et al., 2017). Dentre os microRNAs conservados identificados em cafeeiro, 10 sequências maduras, apresentaram expressão diferencial entre os estádios G4 e G5 de gemas florais em bibliotecas de *sRNA-seq* (FERNANDES-BRUM, dados não

publicados). Estes dados sugerem que os microRNAs podem atuar no processo de antese do cafeeiro.

Ademais, diversos trabalhos mostram que vários microRNAs conservados são responsivos ao etileno, como os miR159, miR156, miR 390, miR164, miR 319 e miR396 em cevada (BAI et al., 2017), miR172, miR319 e miR160 em tomate (WANG et al., 2017) e miR159 e miR394 em arroz (LIU et al., 2009). Alguns estudos também relatam que a expressão de genes que codificam microRNAs é regulada por vários fatores transcricionais (YANT et al., 2010; BAEK et al., 2013). Por exemplo, *ETHYLENE INSENSITIVE3 (EIN3)*, um fator de transcrição chave na sinalização de etileno, se liga diretamente à região promotora de miR164 e reprime sua transcrição (LI et al., 2013). Estes dados reforçam a hipótese de que os microRNAs podem atuar na antese do cafeeiro em resposta ao etileno.

3 HIPÓTESE

Os microRNAs atuam na antese do cafeeiro em resposta ao potencial aumento de etileno nas gemas florais, após aplicação de 1-MCP em plantas sob diferentes condições hídricas.

4 OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da aplicação de 1-MCP sobre a expressão de microRNAs potencialmente responsivos ao etileno em gemas de cafeeiro, assim como caracterizar possíveis alvos destas moléculas, em plantas sob diferentes condições hídricas.

4.1 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão gênica dos microRNAs potencialmente responsivos ao etileno pelo método *stem-loop RT-PCR* em gemas florais de café sob estresse hídrico e sem estresse hídrico, com e sem aplicação de 1-MCP.
- Predizer os alvos para os microRNAs selecionados no genoma de *Coffea canephora* utilizando a ferramenta *psRNATarget*.
- Caracterizar os alvos putativos para cada microRNA por meio da análise de ontologia gênica.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local, período experimental e material vegetal

O experimento foi conduzido na Fazenda Milano (OLAM Agrícola Ltda), localizada na Rodovia BR 020/242 KM 835, Zona Rural, Barreiras - BA, no período de 21 a 23 de Agosto de 2017. Foram utilizadas plantas de oito anos de idade da cultivar Catuaí Vermelho IAC 144. As análises de expressão gênica e predição de alvos para microRNAs foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Molecular de Plantas (LFMP) (<http://www.dbi.ufla.br/lfmp/>), no Setor de Fisiologia Vegetal, Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG – Brasil.

5.2 Tratamentos e delineamento experimental

O experimento foi composto por 2 grupos de plantas, um grupo de plantas sob estresse hídrico, cuja irrigação foi suspensa por 36 dias (potencial hídrico foliar de -1,5 à -2,0 Mpa) e outro grupo de plantas bem hidratadas (potencial hídrico foliar de -0,4 à -0,6 Mpa). Ambos os grupos receberam dois tratamentos, T1 e T0, sendo T0 o grupo controle, sem aplicação de produto e T1 com aplicação de 1-MCP (produto comercial Harvista™ - AgroFresh). Para T1, utilizou-se 150g de ingrediente ativo (i.a.) /ha do Harvista™. Para isso, diluiu-se 78 mL do Harvista™ (formulação líquida) em 4L de água para 20 plantas, sendo que cada planta recebeu 200 mL de calda.

A pulverização das plantas ocorreu no dia 21 de setembro no período da manhã, entre 11:00 e 12:00 horas, com o auxílio de um pulverizador costal de 12L (S12 - Brudden Pulverizadores) logo após a preparação das soluções. A pulverização foi efetuada na planta inteira abrangendo folhas (região adaxial e abaxial) e gemas. Após a pulverização do produto, o grupo de plantas sob estresse hídrico teve sua irrigação retornada. O processo de irrigação durou 3 dias para ser completado, devido a irrigação ser feita por um pivô central.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com 2 tratamentos e 4 repetições biológicas, com cada repetição biológica composta por 5 plantas, totalizando 20 plantas por tratamento. Quatro linhas, denominadas blocos, agruparam as repetições biológicas e entre cada bloco existia uma linha de plantas como bordadura. A localização das repetições biológicas nos blocos ocorreu aleatoriamente, preservando-se um espaço considerável entre cada planta para que não houvesse interferência entre os tratamentos.

5.3 Coleta do material

Para as análises de expressão gênica, coletaram-se gemas no estádio G4, de acordo com Morais et al. (2008), de ramos plagiotrópicos, preferencialmente no terço médio das plantas. As coletas foram realizadas às 13:00 horas por três dias consecutivos, a partir do dia da aplicação do produto, totalizando 3 coletas. O material foi coletado em tubos plásticos de 50 mL, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e em seguida armazenados em ultrafreezer -80 °C até o momento das análises. A Tabela 1 mostra a nomenclatura utilizada nas amostras.

Tabela 1 – Descrição das abreviações utilizadas nas amostras.

Abreviação	Descrição
D1	Plantas não irrigadas
D2	Plantas após retorno da irrigação (durante re-irrigação)
D3	Plantas completamente re-irrigadas
I	Plantas constantemente irrigadas
T0	Tratamento controle, sem aplicação de 1-MCP
T1	Tratamento com aplicação de 1-MCP

Fonte: Do autor, 2018.

5.4 Análise da expressão gênica

5.4.1 Extração de RNA e tratamento com DNase

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

Inicialmente, adicionou-se 600 µL de tampão de lise ao material macerado e homogeneizou-se a amostra em agitador por 1 minuto, em seguida, adicionou-se 600 µL de ácido-fenol: clorofórmio (pH 4,5) e homogeneizou-se por mais 1 minuto. Centrifugou-se a mistura por 10 minutos a 12.000 x g em temperatura ambiente, coletou-se 600 µL do sobrenadante e transferiu-se para novos microtubos. Adicionou-se 300 µL de álcool 99% e homogeneizou-se a mistura por 1 minuto. Transferiu-se a mistura para uma coluna de filtragem do kit, centrifugou-se por 15 segundos a 12.000 x g a temperatura ambiente e descartou-se o fluxo contínuo. Realizou-se a primeira etapa de lavagem, adicionando-se 350

μL do tampão I à coluna, centrifugando-se por 15 segundos a 12.000 x g a temperatura ambiente e descartando-se o fluxo contínuo.

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

5.4.2 Quantificação e análise da qualidade do RNA

Após a extração do RNA, as amostras foram quantificadas e analisadas quanto à presença de contaminantes utilizando-se o espectrofotômetro *NanoVue*[®] (GE Healthcare). Utilizou-se 1,5 μL de cada amostra para realizar essa análise, observando-se as relações de pureza A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} , priorizando-se, preferencialmente, valores entre 1,8 e 2,0.

Para avaliar a integridade do RNA extraído, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose (0,7%), corado com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* (Sigma Aldrich) e visualizado em fotodocumentador UV-transiluminador (UVITEC FireReader XS D-77Ls-20. M). Para obtenção do RIN (*RNA integrity number*), foi utilizado o sistema *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies), seguindo as recomendações do fabricante para RNA de plantas, padronizando as amostras para aproximadamente 400 ng/ μL . Foram utilizados apenas os RNAs que apresentaram RIN acima de 7.

5.4.3 Seleção dos microRNAs

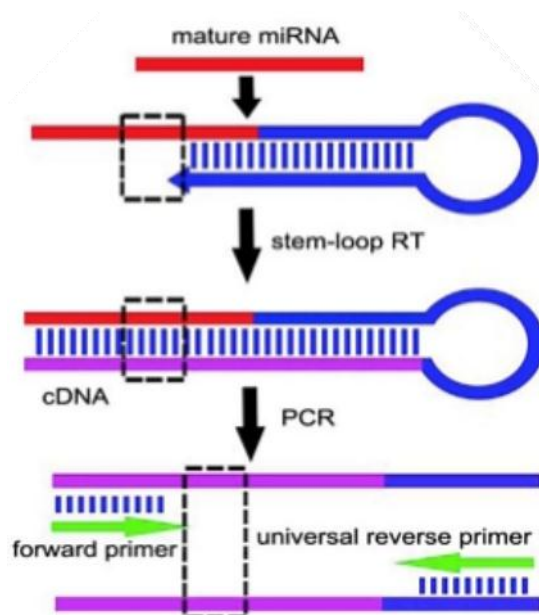
As sequências dos microRNAs escolhidos foram identificadas em *Coffea arabica* por Fernandes-Brum (dados não publicados), com base na expressão diferencial de microRNAs

entre as fases G4 e G5 de gemas florais de café. Foram selecionados 4 famílias MIRs: miR396, miR156, miR172 e miR319.

5.4.4 Síntese de cDNA

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

Figura 6 – Amplificação de microRNAs por stem-loop-RT-PCR



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

Fonte: Gao et al. (2012).

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

5.4.5 Expressão dos microRNAs por *stem-loop RT-PCR*

As análises da expressão dos microRNAs escolhidos (ccp-miR396a-5p, ccp-miR156f-3p, ccp-miR319c-2-3p, ccp-miR172d-1-3p) foram conduzidas utilizando-se o termociclador Rotor-Gene Q Real-Time PCR (Qiagen), utilizando o sistema de detecção SYBR® Green. O volume final da reação para cada amostra foi de 15 µL: 7,5 µL de *Master Mix SYBR Green* (QuantiNova *SYBR Green PCR Kit* - Qiagen), *primers* ccp-miR396a-5p, ccp-miR156f-3p, ccp-miR319c-2-3p a 1 mM e ccp-miR172d-1-3p a 2 mM, 1,5 µL de cDNA na diluição 1/25 e o resto do volume completado com água livre de RNase.

Foram utilizadas três repetições biológicas de cada tratamento, sendo utilizadas triplicatas técnicas para cada uma das amostras. As condições de ciclagem utilizadas foram: 5 minutos a 95 °C para ativação da enzima, seguidos de 40 ciclos de 5 segundos a 95 °C e 10 segundos a 60 °C, com uma rampa de *melting* para se avaliar a especificidade da reação de 55 °C a 95 °C, com o aumento de 1 °C a cada 5 segundos. A eficiência de amplificação dos *primers* dos genes alvos e de referência foi determinada por meio de curva de diluição (TABELA 2). A análise da expressão relativa foi calculada utilizando o método descrito por Pfaffl (2001), utilizando os genes de referência *AP47* e *RPL39* (FERNANDES-BRUM et al., 2017). A diferença relativa da expressão de cada gene foi feita com base em uma amostra calibradora, que foi escolhida de acordo com o menor nível de expressão para cada um dos genes no tecido analisado.

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

Genes/microRNA	Primer RT (5' - 3')	Primer Foward (5'- 3')	Primer Reverse (5' - 3')	Eficiência de amplificação	R ²
ccp-miR396a-5p	GTCGTATCCAGT GCAGGGTCCGA GGTATTCGCACT GGATACGACCT GCTG	GTCTACGTTT CACAGCTTTC TT	GTGCAGGGT CCGAGGT	99%	0,99
ccp-miR156f-3p	GTCGTATCCAGT GCAGGGTCCGA GGTATTCGCACT GGATACGACTG TGCT	GGCGTTGAC AGAAGAGAG AG	GTGCAGGGT CCGAGGT	91%	0,99
ccp-miR319c-2-3p	GTCGTATCCAGT GCAGGGTCCGA GGTATTCGCACT GGATACGACGG GAGC	GATTGCTTG GACTGAAGG GA	GTGCAGGGT CCGAGGT	98%	0,99
ccp-miR172d-1-3p	GTCGTATCCAGT GCAGGGTCCGA GGTATTCGCACT GGATACGACCT GCTG	CGGGAATCT TGATGATGC TG	GTGCAGGGT CCGAGGT	110%	0,99
<i>AP47</i>	-	GGTGTACGC TCACCATTTT CATC	AGCCAACAG CACCAGTAA CTTG	97%	0,99
<i>RPL39</i>	-	GCGAAGAAG CAGAGGCAG AA	TTGGCATTGT AGCGGATGG T	91%	0,99

Fonte: Do autor, 2018.

5.5 Predição de alvos para microRNAs

Sequências alvo dos microRNAs selecionados por serem possivelmente responsivos ao etileno, foram preditas usando a ferramenta *psRNATarget*, (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/analysis?function=3>) utilizando os parâmetros *default* (padrão). Para buscar os alvos dos microRNAs, as bibliotecas de RNA foram coletadas de arquivos GFF (CDS+UTR) do projeto genoma de *Coffea canephora* (<http://coffee-genome.org/>).

Buscas por homologia foram realizadas com o algoritmo *blastp* (versão 2.7.1+) comparando todas as 25.574 proteínas anotadas no genoma de *Coffea canephora* (DENOEU et al., 2014) contra a base de dados *Swiss-Prot* (https://web.expasy.org/docs/swiss-prot_guideline.html). Posteriormente, estes alinhamentos foram enriquecidos com termos de ontologia gênica utilizando o programa *Blast2GO* (versão 5.0) e os resultados foram exportados na forma de tabelas codificadas em arquivos de texto.

Scripts em *bash* foram desenvolvidos para a identificação dos termos de ontologia gênica referentes aos alvos de cada microRNA. Posteriormente, o conjunto de termos identificados para os alvos foram analisados utilizando o método *Singular Enrichment Analysis* (SEA) da ferramenta *AgriGO* (<http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/analysis.php>) (DU et al., 2010). Os termos foram comparados contra o *background* de *Coffea canephora* para a identificação de termos de ontologia enriquecidos entre os alvos.

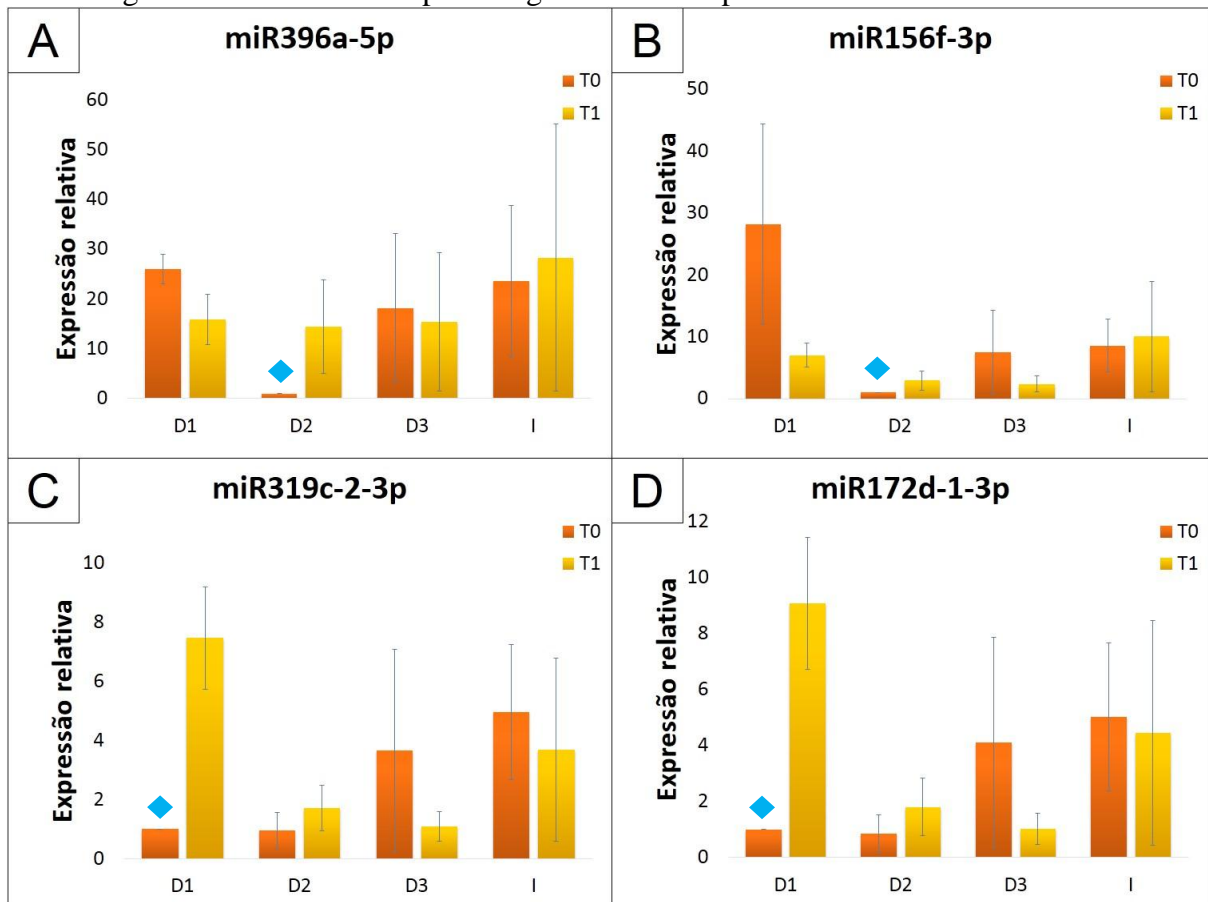
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Análise da expressão gênica

A análise da expressão gênica possibilitou dividir os microRNAs analisados em dois grupos, sendo ambos responsivos à aplicação do 1-MCP, mas um grupo de resposta positiva e outro negativa. Na Figura 7-A, observa-se que houve diminuição da expressão do miR396a-5p, nas gemas das plantas que estavam sob estresse hídrico (D1) e receberam aplicação do 1-MCP (T1), apresentando expressão 25 vezes maior que a amostra calibradora D2T0. Já a amostra D1T1 apresentou expressão do *miR396a-5p* 14 vezes maior que na amostra D2T0. Em D2 (irrigação incompleta) o tratamento com aplicação de 1-MCP, apresentou expressão 13 vezes maior que a amostra calibradora. Já em D3 (irrigação completa) e I (plantas constantemente irrigadas) não houve diferença de expressão entre os tratamentos.

A aplicação do produto influenciou na expressão deste microRNA nas plantas que estavam sob estresse hídrico e nas plantas que tiveram sua irrigação retornada, porém o mesmo não ocorreu nas plantas completamente re-irrigadas, nem nas plantas constantemente irrigadas.

Figura 7 – Gráficos de expressão gênica relativa para os microRNAs analisados.



Legenda: A cor laranja representa o tratamento 0 (T0 - sem aplicação de 1-MCP) e a cor amarela representa o tratamento 1 (T1 - com aplicação de 1-MCP). **A** - Dados de expressão para o miR396a-5p, **B** - Dados de expressão para o miR156f-3p, **C** - Dados de expressão para o miR319c-2-3p e **D** - Dados de expressão para o miR172d-1-3p. ◆ : Amostra calibradora

Fonte: Do autor (2018).

O miR396, é constantemente relacionado ao estresse abiótico (LIU et al., 2008, ZHOU et al., 2010, GIACOMELLI et al., 2012), inclusive na tolerância a seca (YANG; YU, 2009). Possivelmente, sua expressão diminuiu em D1T1 em relação a D1T0, porque as plantas em D1T0 estavam sob estresse hídrico e a aplicação do 1-MCP deu início aos processos de resposta a esse estímulo, já que já foi verificado que a aplicação de 1-MCP exerce papel semelhante ao da chuva ou irrigação na antese do cafeeiro, possivelmente no aumento dos níveis de etileno (LIMA, 2015; SANTOS, 2016). O aumento dos níveis de etileno em plantas que passaram por um período de estresse e depois foram re-irrigadas, já foi observado, como em rosas (MENG et al., 2014) e *Citrus reshni* (TUDELA; PRIMO-MILLO, 1992). Ao se comparar D1T0 com D2T0, observa-se que o retorno da irrigação tem grande efeito sobre a expressão deste microRNA, pois os níveis de expressão são bem reduzidos em D2T0, fato que pode estar relacionado com o papel deste microRNA na tolerância à seca.

Na Figura 7-B, a análise da expressão gênica para o miR156f-3p mostra que também houve diminuição da expressão do miR156f-3p de D1T0 para D1T1, em relação a amostra calibradora, a amostra D1T0 apresentou expressão 27 vezes maior, enquanto à amostra D1T1 apresentou expressão 6 vezes maior. Em D2, a expressão de D2T1 é duas vezes maior que amostra calibradora. Novamente, as plantas completamente irrigadas após estresse hídrico (D3) e constantemente irrigadas (I) não apresentaram diferenças de expressão entre os tratamentos.

Para o miR319c-2-3p, a expressão gênica mostrou um comportamento inverso para este microRNA em relação aos anteriores, pois em D1T1 houve um aumento de 6 vezes da expressão, em relação a amostra calibradora (D1T0) (FIGURA 7-C). No entanto, para as outras amostras, onde houve irrigação, não houve diferença de expressão entre os tratamentos. O miR172d-1-3p, segue o mesmo padrão de expressão observado para o miR319c-2-3p, em que a aplicação do 1-MCP promoveu a expressão deste microRNA (FIGURA 7-D). Houve um aumento da expressão deste microRNA de 8 vezes em D1T1 em relação a amostra calibradora (D1T0). Para as outras amostras em que houve irrigação, também não houve diferença de expressão entre os tratamentos.

Os fatores de resposta ao etileno (*ERFs*) constituem o maior grupo da família de fatores de transcrição *AP2/EREBP* (proteínas de ligação ao elemento responsivo ao etileno) e já foram caracterizados como os principais alvos da família 172 em *Arabidopsis* (WU et al., 2009) e tomate (CHENG et al., 2016; WANG et al., 2017). Apesar do miR319 atuar no controle da morfogênese e desenvolvimento foliar através da regulação dos fatores de transcrição *TCP* (PALATNIK et al., 2003), os fatores de transcrição *GAMYB*, que atuam na via de sinalização do etileno, também já foram caracterizados como alvos para este microRNA (WANG et al., 2017). Os alvos relatados podem estar sendo ativados com o aumento da expressão relativa do miR172 e miR319 nas amostras que receberam aplicação de 1-MCP (D1T6), pois a aplicação do produto pode ter resultado no aumento dos níveis de etileno e ambos os alvos estão relacionados com o etileno.

Também é possível notar que miR156 e miR172 apresentam perfis de expressão contrários em relação a aplicação de 1-MCP, com o miR156 sendo reprimido e miR172 induzido. Estes microRNAs possuem ação antagônica, pois os alvos do miR156 (*SPL9* e *SPL10*) (YAMAGUCHI; ABE, 2012) ativam a expressão do miR172 e atuam na transição da fase vegetativa para a reprodutiva. O miR156 é mais expresso na fase juvenil da planta e sua expressão vai diminuindo à medida que a expressão do miR172 vai aumentando. Talvez, um mecanismo parecido esteja atuando na quebra da dormência das gemas no estágio G4 em

cafeeiro. Na dormência o miR156 está mais expresso e quando as gemas voltam a se desenvolver a expressão deste miRNA cai e a do miR172 aumenta.

Dos quatro microRNAs avaliados neste trabalho, apenas o miR172d-2-3p não apresentou o mesmo perfil de expressão observado no trabalho de Fernandes-Brum (dados não publicados), em que foram identificados 10 microRNAs diferencialmente expressos entre bibliotecas de *sRNA-seq* dos estádios G4 e G5 de gemas de cafeeiro em condições de campo. Considerando que em G5, as gemas florais já retomaram seu crescimento devido à chuva ou irrigação, podemos comparar esta fase com o tratamento T1, em que houve aplicação de 1-MCP, já que o produto produz o mesmo efeito que a chuva ou irrigação na antese do cafeeiro. No entanto é importante ressaltar que a análise neste trabalho foi feita em um menor período de tempo em relação a transição da fase G4 para G5.

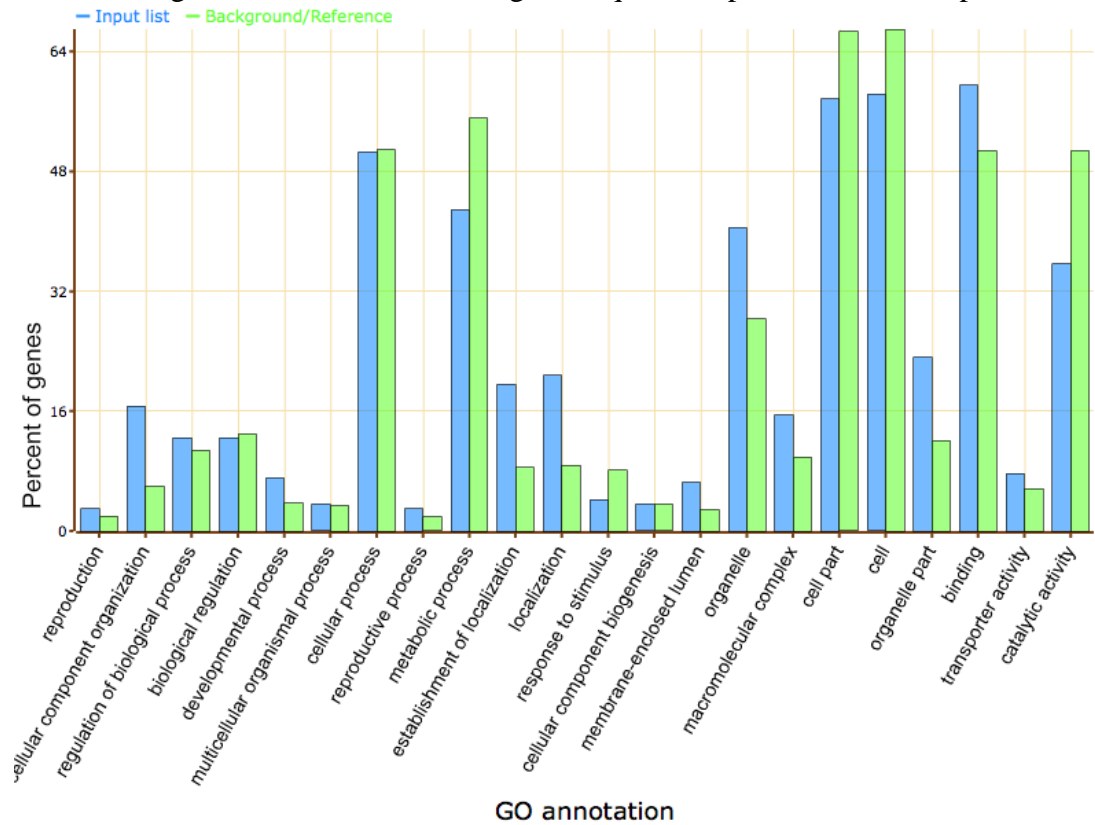
O fato de não haver diferença na expressão gênica entre os tratamentos T0 e T1 nas plantas completamente re-irrigadas pode ser explicado devido a resposta a aplicação de 1-MCP ser rápida e no momento que as amostras foram coletadas a resposta já pode ter ocorrido. Também não houve diferença entre os tratamentos T0 e T6, nas plantas constantemente irrigadas para todos os microRNAs, provavelmente isso ocorreu porque a aplicação de 1-MCP e a chuva ou irrigação, promovem a mesma resposta na planta, um provável aumento dos níveis de etileno e a antese (LIMA, 2015; SANTOS; 2016). Sabe-se que para que haja uma concentração da florada é necessário que o cafeeiro passe por um período moderado de estresse hídrico antes da chuva ou irrigação (ALVIM, 1960; MAGALHÃES; ANGELOCCI 1976; CRISOSTO et al., 1992). Na hipótese de Lima (2015), este período é necessário para que haja uma concentração dos níveis de ACC na raiz, para que com a chuva ou irrigação, eles sejam transportados para a parte aérea. No entanto, as plantas constantemente irrigadas não passaram por um período de estresse, o que provavelmente fez com que as mesmas não tivessem resposta a aplicação do produto em relação a expressão dos microRNAs.

6.2 Análise dos termos de Ontologia gênica para os alvos preditos dos microRNA

Após o *BLASTp* de todas as proteínas de *Coffea canephora* contra o banco de dados *SwissProt*, aproximadamente 82% das proteínas retornaram alinhamentos significativos com essa base de dados. Com este refinamento, o número de alvos preditos foi de 185 para o miR396a-5p, 52 para o miR172d-1-3p, 118 para o miR156f-3p e 137 para o miR319c-2-3p.

Na análise de enriquecimento dos termos de ontologia para o miR319a-5p, foram encontrados 22 termos enriquecidos (FIGURA 8). Alguns dos termos enriquecidos foram resposta para estímulos, regulação biológica e processos metabólicos.

Figura 8 – Termos de ontologia enriquecidos para o miR396a-5p.

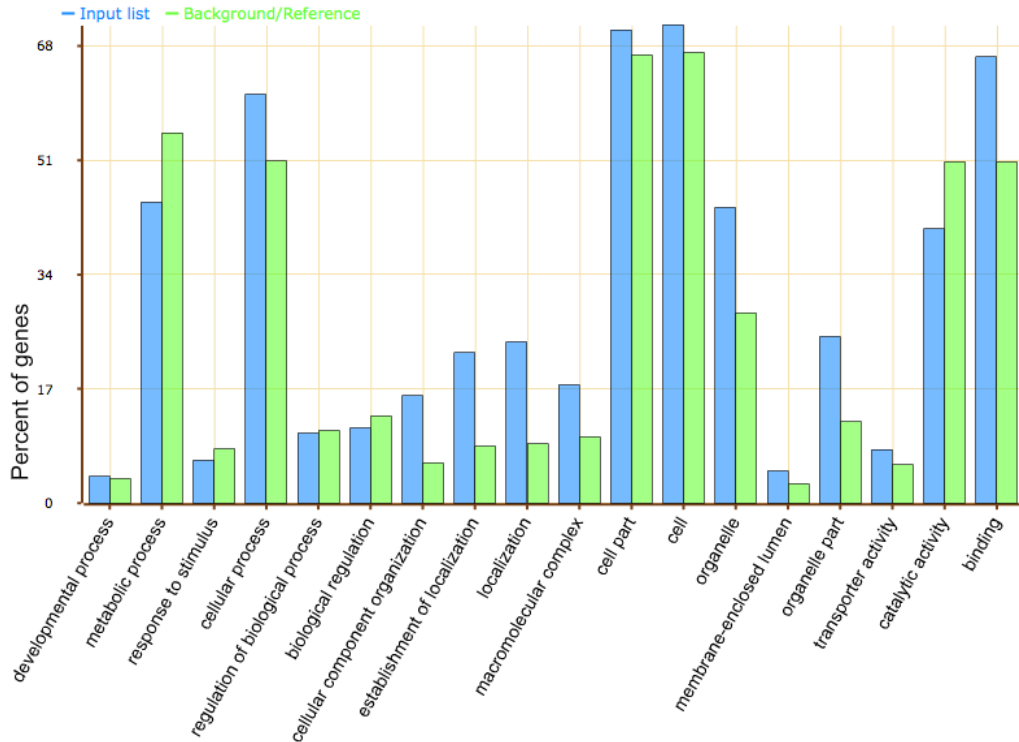


Fonte: Do autor, (2018).

Para o miR156f-3p, não foram encontrados termos enriquecidos, porém, foram identificados genes da família *SPL* como possíveis alvos deste microRNA. Os genes da família *SPL* como *SPL9* e *SPL10* já foram descritos anteriormente como alvos desta família de microRNAs. Estes genes ativam a expressão do miR172 e atuam na transição da fase vegetativa para a reprodutiva (YAMAGUCHI; ABE, 2012).

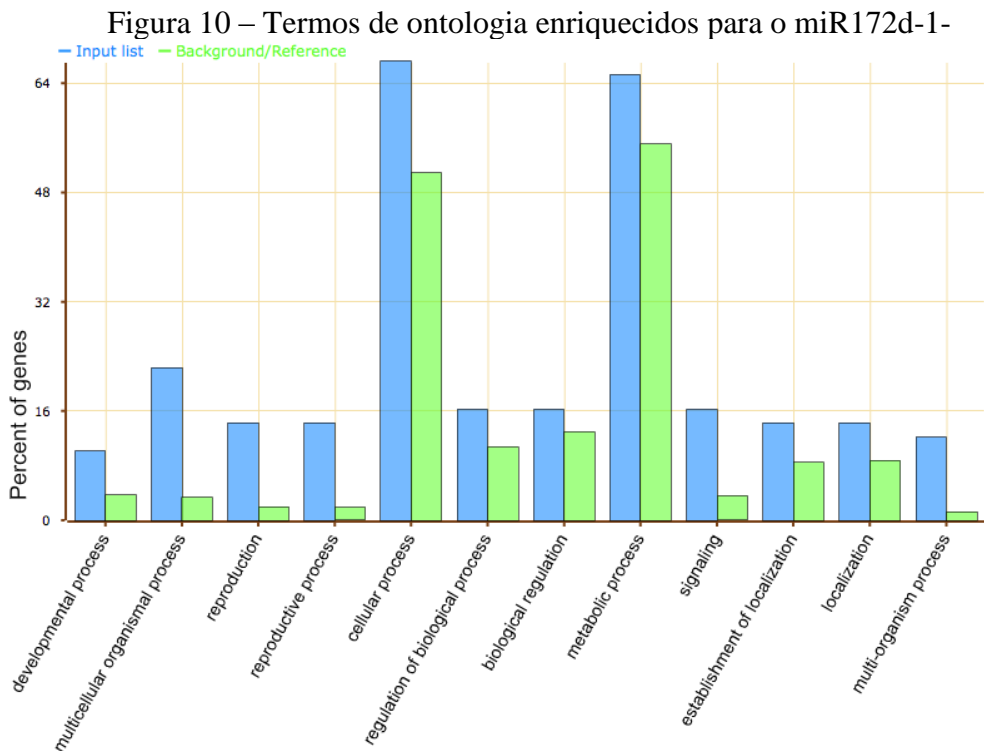
Para o miR319c-2-3p foram encontrados 18 termos enriquecidos (FIGURA 10). Alguns dos termos significativos foram resposta para estímulos, atividade catalítica, processos metabólicos e regulação de processos biológicos.

Figura 9 – Termos de ontologia enriquecidos para o miR319c-2-3p.



GO annotation
 Fonte: Do autor, (2018).

Para o miR172d-1-3p, foram identificados 12 termos enriquecidos (FIGURA 11). Alguns dos termos significativos para este microRNA são sinalização, regulação biológica e processo reprodutivo.



3p.
 GO annotation
 Fonte: Do autor, (2018).

Os termos de ontologia gênica enriquecidos para os alvos putativos do miR396, miR319 e miR172, principalmente, repostas a estímulos, atividade catalítica, processos metabólicos, regulação de processos biológicos e sinalização, dão a ideia de que estes microRNAs atuam na regulação de vias de sinalização. Estudos anteriores indicaram que os alvos dos microRNAs conservados também são conservados e a maioria das famílias de microRNAs compartilham alvos em comum (JIN et al., 2008; LU et al., 2008; WANG et al., 2017). Desta forma, o fato de alguns termos de ontologia gênica se repetirem nos alvos putativos de cada microRNA, dá a ideia de que muitos desses alvos estão relacionados com o mesmo processo biológico e que estas vias interagem entre si.

7. CONCLUSÃO

Os quatro microRNAs analisados neste trabalho apresentaram resposta logo após a aplicação de 1-MCP nas plantas que estavam sob estresse hídrico. miR396a-5p e miR156f-3p foram reprimidos e miR319c-2-3p e miR172d-1-3p foram induzidos. Já para as plantas completamente re-irrigadas e constantemente irrigadas não houve diferença de expressão para os quatro microRNAs entre os tratamentos.

A expressão antagônica de miR156f-3p e miR172d-2-3p, pode estar relacionada à quebra da dormência das gemas florais no estágio G4 de forma análoga a mudança da fase vegetativa para a fase reprodutiva. A análise dos termos de ontologia gênica para os alvos preditos para cada microRNA indica que eles podem estar envolvidos nas vias de sinalização hormonal, inclusive para o etileno.

Para que haja maior entendimento do papel dos microRNAs analisados na resposta à aplicação de 1-MCP em plantas sob diferentes condições hídricas, será necessário fazer também em trabalhos futuros, a análise da expressão gênica dos alvos destes microRNAs e também de genes relacionados com a biossíntese do etileno.

8. REFERÊNCIAS

- ABE, M. et al. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. **Science**, v. 309, n. 5737, p. 1052-1056, 2005.
- ABELES, F. B.; MORGAN, P. W.; SALTVEIT, J. R. **Ethylene in plant biology**. 2. ed. London: Academic press, 414 p., 1992.
- ACHARD, P. et al. Ethylene regulates Arabidopsis development via the modulation of DELLA protein growth repressor function. **The Plant Cell**, v. 15, n. 12, p. 2816-2825, 2003.
- ACHARD, P. et al. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. **Development**, v. 131, n. 14, p. 3357-3365, 2004.
- AGUIAR, A. T. E. et al. Caracterização de cultivares de *Coffea arabica* mediante utilização de descritores mínimos. **Bragantia**, v. 63, n. 2, p. 179-192, 2004.
- ALVIM, P. Moisture stress as a requirement for flowering of coffee. **Science**, v. 132, n. 3423, p. 354-354, 1960.
- ALVIM, P. T. **Factors affecting flowering of coffee**. In: Genes Enzymes and Population. New York: Plenum, SBR, A M. p.193-202, 1973.
- ANTHONY, F. et al. Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. **Euphytica**, v. 18, n. 1, p. 53 - 65, 2001.
- ARTEAGA-VÁSQUEZ, M.; CALLABERO-PEREZ, J.; VIELLE-CALZADA J. P. A family of miRNAs present in plants and animals. **The Plant Cell**, v. 18, n. 12 p. 3355-3369, 2006.
- AUKERMAN, M. J.; SAKAI, H. Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its APETALA2-like target genes. **The Plant Cell**, v. 15, n. 11, p. 2730-2741, 2003.
- AXTELL, M. J.; WESTHOLM, J. O.; LAI, E. C. Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. **Genome biology**, v. 12, n. 4, p. 221, 2011.
- BAEK, D. et al. The role of Arabidopsis MYB2 in miR399f-mediated phosphate-starvation response. **Plant signaling & behavior**, v. 8, n. 3, p. 362-73, 2013.
- BAI, B. et al. microRNAs participate in gene expression regulation and phytohormone cross-talk in barley embryo during seed development and germination. **BMC plant biology**, v. 17, n. 1, p. 150, 2017.
- BARROS, R. S.; MAESTRI, M.; COONS, M. P. The physiology of flowering in coffee: a review. **Journal of Coffee Research**, v.8, n.2-3, p.29-73, 1978.
- BARTHOLOMEW, D. P. Inflorescence development of pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) induced to flower with ethephon. **Botanical Gazette**, v. 138, n. 3, p. 312-320, 1977.
- BÄURLE, I.; DEAN, C. The timing of developmental transitions in plants. **Cell**, v. 125, n. 4, p. 655-664, 2006.
- BLANKENSHIP, S. Ethylene effects and the benefits of 1-MCP. **Perishables Handling Quarterly**, n.108, 2001.

- BLANKENSHIP, S. M.; DOLE, J. M. 1-Methylcyclopropene: a review. **Postharvest biology and technology**, v. 28, n. 1, p. 1-25, 2003.
- BOLOGNA, N. G.; VOINNET, O. The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis. **Annual review of plant biology**, v. 65, p. 473-503, 2014.
- BORNER, R. et al. A MADS domain gene involved in the transition to flowering in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 24, n. 5, p. 591-599, 2000.
- BROWING, G. Environmental control of flower bud development in *Coffea arabica* L. In: LANDSBERG, J.J.; CUTTING, C.V. Environmental effects on crop physiology. New York: **Academic Press**. p. 321- 331, 1977.
- BUDAK, H.; AKPINAR, B. A. Plant miRNAs: biogenesis, organization and origins. **Functional & integrative genomics**, v. 15, n. 5, p. 523-531, 2015.
- BURNS, J. K. 1-Methylcyclopropene Applications in Preharvest Systems: Focus on Citrus. **Hortscience**, v.43, n. 1, p.112-114, 2008.
- CAMARGO, A. P.; CAMARGO, M. B. P. Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. **Bragantia**, v. 60, n. 1, p. 65-68, 2001.
- CAMARGO, A.P.; FRANCO, C. F. **Clima e fenologia do cafeeiro. In: Cultura de café no Brasil: manual de recomendações**. 5.ed. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro do Café, Ministério da Indústria e Comércio, p.1950, 1985.
- CAO, D. et al. Gibberellin mobilizes distinct DELLA-dependent transcriptomes to regulate seed germination and floral development in Arabidopsis. **Plant Physiology**, 142: 509–525, 2006.
- CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 642-655, 2009.
- CHEN, C. et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 33, n. 20, p. e179-e179, 2005.
- CHEN, L. et al. Ethylene-responsive miRNAs in roots of *Medicago truncatula* identified by high-throughput sequencing at whole genome level. **Plant science**, v. 184, p. 14-19, 2012.
- CHEN, X. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. **Science**, v. 303, n. 5666, p. 2022-2025, 2004.
- CHEN, Y. F.; ETHERIDGE, N.; SCHALLER, E. Ethylene signal perception. **Annals of Botany**, v.95, p. 901-915, 2005.
- CHENG, H. et al. Genomic profiling of exogenous abscisic acid-responsive microRNAs in tomato (*Solanum lycopersicum*). **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 423, 2016.
- CHUCK, G. et al. The heterochronic maize mutant Corngrass1 results from overexpression of a tandem microRNA. **Nature genetics**, v. 39, n. 4, p. 544, 2007.
- COEN, E. S.; MEYEROWITZ, E. M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. **Nature**, v. 353, n. 6339, p. 31, 1991.

CONSELHO NACIONAL DE ABASTECIMENTO (**CONAB**). Acompanhamento da Safra Brasileira - Café (Safra 2018), Primeiro levantamento, janeiro de 2018. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/18_01_24_17_34_27_cafe_janeiro2018.pdf> Acesso em: jan. 2018.

COOKE, A. R.; RANDALL, D. I. 2-Haloethanephosphonic acids as ethylene releasing agents for the induction of flowering in pineapples. **Nature**, v. 218, n. 5145, p. 974, 1968.

CRISOSTO, C. H.; GRANTZ, D. A.; MEINZER, F. C. Effect of water deficit on flower opening in coffee (*Coffea arabica* L.). **Tree Physiology**. 10:127-139, 1992.

CSUKASI, F. et al. Two strawberry miR159 family members display developmental-specific expression patterns in the fruit receptacle and cooperatively regulate Fa-GAMYB. **New phytologist**, v. 195, n. 1, p. 47-57, 2012.

DaMATTA, F. M.; RAMALHO, J. D. C. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 55-81, 2006.

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

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

DEBAT, H. J.; DUCASSE, D. A. Plant microRNAs: Recent Advances and Future Challenges. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 32, n. 6, p. 1257-1269, 2014.

DEBERNARDI, J. M. et al. Functional specialization of the plant miR396 regulatory network through distinct microRNA–target interactions. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 1, p. e1002419, 2012.

DENOEUDE, F. et al. The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. **Science**, v. 345, n. 6201, p. 1181-1184, 2014.

DIAS, R. E. B. A. **Influência do uso de inibidor da biossíntese de etileno sobre a eficiência da colheita mecanizada do café**. 2013. 61 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

DONG, Z.; HAN, M. H.; FEDOROFF, N. The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. **PANAS**, v. 105, n. 29, p. 9970-5, 2008.

DU, Z. et al. agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. **Nucleic acids research**, v. 38, n. suppl_2, p. W64-W70, 2010.

DUKOVSKI, D.; BERNATZKY, R.; HAN, S. Flowering induction of *Guzmania* by ethylene. **Scientia horticultrae**, v. 110, n. 1, p. 104-108, 2006.

ESPINOSA, M. E. Á. et al. Early histological, hormonal, and molecular changes during pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill) artificial flowering induction. **Journal of plant physiology**, v. 209, p. 11-19, 2017.

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

- FERNANDES-BRUM, C. N. et al. A genome-wide analysis of the RNA-guided silencing pathway in coffee reveals insights into its regulatory mechanisms. **PloS one**, v. 12, n. 4, p. e0176333, 2017.
- FERNANDES-BRUM, C. N. et al. Um painel dos genes de referência mais adequados para os estudos de expressão RT-qPCR do café: triagem sua estabilidade sob diferentes condições. **Tree Genetics & Genomes**, v. 13, n. 6, p. 131, 2017.
- FUKAZAWA, J. et al. DELLAs function as coactivators of GAI-ASSOCIATED FACTOR1 in regulation of gibberellin homeostasis and signaling in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 26, n. 7, p. 2920-2938, 2014.
- GAO, L. et al. A new strategy for identification of highly conserved microRNAs in non-model insect, *Spodoptera litura*. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 1, p. 612-627, 2012.
- GIACOMELLI, J. I. et al. Role of recently evolved miRNA regulation of sunflower HaWRKY6 in response to temperature damage. **New Phytologist**, v. 195, n. 4, p. 766-773, 2012.
- GOCAL, G. F. W et al. GAMYB-like genes, flowering, and gibberellin signaling in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 127, n. 4, p. 1682-1693, 2001.
- GOUVEIA, N. M. **Estudo da diferenciação e crescimento das gemas florais de *Coffea arabica* L.: observações sobre antese e maturação dos frutos**. 1984. 237 p. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, 1984.
- GRBIĆ, V.; BLEECKER, A. B. Ethylene regulates the timing of leaf senescence in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 8, n. 4, p. 595-602, 1995.
- GREGIS, V. et al. The Arabidopsis floral meristem identity genes AP1, AGL24 and SVP directly repress class B and C floral homeotic genes. **The Plant Journal**, v. 60, n. 4, p. 626-637, 2009.
- GUERRA, A. F. et al. **Irrigação do Cafeeiro no Cerrado: estratégia de manejo de água para uniformização da florada**. Comunicado Técnico – EMBRAPA, 2005.
- GUERREIRO-FILHO, O. et al. **Origem e classificação botânica do Cafeeiro**. In: CARVALHO, C. H. S. (Ed.). Cultivares de café: origem, características e recomendações. Cultivares de café: origem, características e recomendações. Brasília: Embrapa Café, p. 23-30, 2008.
- GUINN, G. Water deficit and ethylene evolution by young cotton bolls. **Plant Physiology**, v. 57, n. 3, p. 403-405, 1976.
- HALL, A. E. et al. Ethylene perception by the ERS1 protein in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 123, n. 4, p. 1449-1458, 2000.
- HAN, S. S. et al. Enhancement of growth and flowering of *Triteleia laxa* by ethylene. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 115, n. 3, p. 482-486, 1990.
- IRISH, V. F. The flowering of Arabidopsis flower development. **The Plant Journal**, v. 61, n. 6, p. 1014-1028, 2010.

- JANG, S.; TORTI, S.; COUPLAND, G. Genetic and spatial interactions between FT, TSF and SVP during the early stages of floral induction in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 60, n. 4, p. 614-625, 2009.
- JOHNSON, P. R.; ECKER, J. R. The ethylene gas signal transduction pathway: a molecular perspective. **Annual review of genetics**, v. 32, n. 1, p. 227-254, 1998.
- JONES, M. L.; WOODSON, W. R. Pollination-induced ethylene in carnation (role of stylar ethylene in corolla senescence). **Plant Physiology**, v. 115, n. 1, p. 205-212, 1997.
- KENDE, H. Ethylene biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 44, n. p. 283-307, 1993.
- KIM, S. et al. Phylogeny and domain evolution in the APETALA2-like gene family. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 1, p. 107-120, 2006.
- KOBAYASHI, Y; WEIGEL, D. Move on up, it's time for change—mobile signals controlling photoperiod-dependent flowering. **Genes & development**, v. 21, n. 19, p. 2371-2384, 2007.
- KURIHARA, Y. et al. The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. **Rna**, v.12, n. 2, p. 206-212, 2006.
- LASHERMES, P. et al. Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 261, n. 2, p. 259-266, 1999.
- LEE, H. et al. The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in Arabidopsis. **Genes & development**, v. 14, n. 18, p. 2366-2376, 2000.
- LEE, J. et al. SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates LEAFY. **The Plant Journal**, v. 55, n. 5, p. 832-843, 2008.
- LEE, J. H. et al. Role of SVP in the control of flowering time by ambient temperature in Arabidopsis. **Genes & development**, v. 21, n. 4, p. 397-402, 2007.
- LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843-854, 1993.
- LI, D. et al. A repressor complex governs the integration of flowering signals in Arabidopsis. **Developmental cell**, v. 15, n. 1, p. 110-120, 2008.
- LI, S. The Arabidopsis thaliana TCP transcription factors: a broadening horizon beyond development. **Plant signaling & behavior**, v. 10, n. 7, p. e1044192, 2015.
- LI, Z. et al. Ethylene-insensitive3 is a senescence-associated gene that accelerates age-dependent leaf senescence by directly repressing miR164 transcription in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 25, n. 9, p. 3311-3328, 2013.
- LIMA, A. A. **Ethylene regulation under different watering conditions and its possible involvement in coffee (*Coffea arabica* L.) flowering**. 2015. 151 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

- LIU, C. et al. Specification of Arabidopsis floral meristem identity by repression of flowering time genes. **Development**, v. 134, n. 10, p. 1901-1910, 2007.
- LIU, C.; THONG, Z.; YU, H. Coming into bloom: the specification of floral meristems. **Development**, v. 136, n. 20, p. 3379-91, Oct 2009.
- LIU, D. et al. An organ-specific role for ethylene in rose petal expansion during dehydration and rehydration. **Journal of Experimental Botany**, p. 2333–2344, 2013.
- LIU, H. et al. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. **Rna**, v. 14, n. 5, p. 836-843, 2008.
- LIU, Q. et al. Expression analysis of phytohormone-regulated microRNAs in rice, implying their regulation roles in plant hormone signaling. **FEBS letters**, v. 583, n. 4, p. 723-728, 2009.
- LIVRAMENTO, D. E. **Morfologia e Fisiologia do Cafeeiro**. In: REIS, P. R.; CUNHA, R. L. (Ed). Café Arábica do plantio a colheita. Lavras: U.R. EPAMIG SM, 896 p., 2010.
- LOHMANN, J. U.; WEIGEL, D. Building beauty: the genetic control of floral patterning. **Developmental cell**, v. 2, n. 2, p. 135-142, 2002.
- MAGALHÃES, A. C.; ANGELOCCI, L. R. Sudden alterations in water balance associated with flower bud opening in coffee plants. **Journal of Horticultural Science**, v. 51, n. 3, p. 419-421, 1976.
- MAJEROWICZ, N.; SÖNDAHL, M. R. Induction and differentiation of reproductive buds in *Coffea arabica* L. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 2, p. 247-254, 2005.
- MARGIS, R. et al. The evolution and diversification of Dicers in plants. **FEBS Letters**, v. 580, n. 10, p. 2442-2450, 2006.
- MCKEON, T. A.; FERNÁNDEZ-MACULET, J. C.; YANG, S. **Biosynthesis and metabolism of ethylene**. In: Plant hormones. Springer, Dordrecht, p. 118-139, 1995.
- MCKEON, T. A.; HOFFMAN, N. E.; YANG, S. F. The effect of plant-hormone pretreatments on ethylene production and synthesis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in water-stressed wheat leaves. **Planta**, v. 155, n. 5, p. 437-443, 1982.
- MELZER, S. et al. Flowering-time genes modulate meristem determinacy and growth form in *Arabidopsis thaliana*. **Nature genetics**, v. 40, n. 12, p. 1489, 2008.
- MENG, Y. et al. Precise spatio-temporal modulation of ACC synthase by MPK6 cascade mediates the response of rose flowers to rehydration. **The Plant Journal**, p. 941-50, 2014.
- MICHAELS, S. D. et al. AGL24 acts as a promoter of flowering in *Arabidopsis* and is positively regulated by vernalization. **The Plant Journal**, v. 33, n. 5, p. 867-874, 2003.
- MILLAR, A. A.; GUBLER, F. The Arabidopsis GAMYB-like genes, MYB33 and MYB65, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development. **The Plant Cell**, v. 17, n. 3, p. 705-721, 2005.
- MORAIS, H. et al. Escala fenológica detalhada da fase reprodutiva de *Coffea arabica*. **Bragantia** v. 67, n.1, p. 257-260, 2008.

- MOXON, S. et al. Deep sequencing of tomato short RNAs identifies microRNAs targeting genes involved in fruit ripening. **Genome research**, v. 18, n. 10, p. 1602-1609, 2008.
- MÜLLER, R. et al. Cultivar differences in regulation of ethylene production in miniature rose flowers (*Rosa hybrida* L.). **Gartenbauwissenschaft**, v. 66, n. 1, p. 34-38, 2001.
- O'MAOILEIDIGH, D. D. Gene networks controlling *Arabidopsis thaliana* flower development. **New Phytologist**, v. 201, n. 1, p. 16-30, 2014.
- OKAMURO, JACK K. et al. The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 13, p. 7076-7081, 1997.
- OMIDBAKHSHFARD, M. A. et al. Growth-regulating factors (GRFs): a small transcription factor family with important functions in plant biology. **Molecular plant**, v. 8, n. 7, p. 998-1010, 2015.
- PALATNIK, J. F. et al. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. **Nature**, v. 425, n. 6955, p. 257, 2003.
- PARK, M. Y. et al. Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 10, p. 3691-3696, 2005.
- PEI, H. et al. Integrative analysis of miRNA and mRNA profiles in response to ethylene in rose petals during flower opening. **PLoS one**, v. 8, n. 5, p. e64290, 2013.
- PEREIRA, L. F. P. et al. Ethylene production and acc oxidase gene expression during fruit ripening of *Coffea arabica* L. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 3, p. 283-289, 2005.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, 2001.
- PILCHER, R. L. Rusholme et al. Identification of novel small RNAs in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Planta**, v. 226, n. 3, p. 709-717, 2007.
- 'POSE, D.; YANT, L.; SCHMID, M. The end of innocence: flowering networks explode in complexity. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 45-50, 2012.
- RAMACHANDRAN, V.; CHEN, X. Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. **Science**, v. 321, n. 5895, p. 1490-1492, 2008.
- REID, M. S. et al. Ethylene and silver thiosulfate influence opening of cut rose flowers. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 1989.
- RENA, A. B.; MAESTRI, M. **Fisiologia do cafeeiro**. In: RENA, A. B. et al. (Ed.). *Cultura do cafeeiro-Fatores que afetam a produtividade*. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, p.13-106, 1986.
- RENA, A. B; BARROS, R. S. **Aspectos críticos no estudo da floração do café**. In: Zambolim, L. (Ed.). *Efeitos da Irrigação Sobre a Qualidade e Produtividade do Café*. Universidade Federal de Viçosa, p.149-172, 2004.

- REZENDE, P. M. **pipeMIRSEQ: um pipeline integrativo para análises de expressão diferencial em dados de miRNA-seq de plantas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.
- ROGERS, K.; CHEN, X. Biogenesis, Turnover, and Mode of Action of Plant MicroRNAs. **Plant Cell**, v. 25, n. 7, p. 2383-2399, 2013.
- RONCHI, C. P. et al. Respostas ecofisiológicas de cafeeiros submetidos ao déficit hídrico para concentração da florada no Cerrado de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 1, p. 24-32, 2015.
- RUBIO-SOMOZA, I.; WEIGEL, D. Coordination of flower maturation by a regulatory circuit of three microRNAs. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 3, p. e1003374, 2013.
- SAKIYAMA, N. S.; PEREIRA, A. A.; ZAMBOLIM, L. **Melhoramento de café arábica**. In: BOREM, A. (Ed.). Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: UFV, p. 189-204, 1999.
- SANTOS, I. S. **Influência do etileno na regulação do florescimento de *Coffea arabica* L.** 2016. 105 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- SCHRODER, R. et al. Reduction of ethylene emission from Scots pine elicited by insect egg secretion. **Journal of Experimental Botany**, 58: 1835-1842, 2007.
- SEARLE, I. et al. The transcription factor FLC confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in Arabidopsis. **Genes & development**, v. 20, n. 7, p. 898-912, 2006.
- SEKI, M. et al. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. **Current opinion in plant biology**, v. 10, n. 3, p. 296-302, 2007.
- SHAKEEL, S. N. et al. Mechanisms of signal transduction by ethylene: overlapping and non-overlapping signalling roles in a receptor family. **AoB plants**, v. 5, p. plt010, 2013.
- SILVA, E. M. et al. microRNA156-targeted SPL/SBP box transcription factors regulate tomato ovary and fruit development. **The Plant Journal**, v. 78, n. 4, p. 604-618, 2014.
- SISLER, E. C. The discovery and development of compounds counteracting ethylene at the receptor level. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 4, p. 357-367, 2006.
- SOLANO, R. et al. Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. **Genes & development**, v. 12, n. 23, p. 3703-3714, 1998.
- SRIKANTH, A.; SCHMID, M. Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 12, p. 2013-2037, 2011.
- SU, C. et al. A modified ABCDE model of flowering in orchids based on gene expression profiling studies of the moth orchid *Phalaenopsis aphrodite*. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e80462, 2013.
- SUGE, H. Inhibition of photoperiodic floral induction in *Pharbitis nil* by ethylene. **Plant and cell physiology**, v. 13, n. 6, p. 1031-1038, 1972.

- TAN, H. et al. Ethylene-influenced flower opening and expression of genes encoding ETRs, CTRs, and EIN3s in two cut rose cultivars. **Postharvest Biology and Technology**, v. 40, n. 2, p. 97-105, 2006.
- TANG, G. Plant microRNAs: An insight into their gene structures and evolution. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 21, n. 8, p. 782-789, 2010.
- TANG, X.; WOODSON, W. R. Temporal and spatial expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase mRNA following pollination of immature and mature petunia flowers. **Plant Physiology**, v. 112, n. 2, p. 503511, 1996.
- THEIßEN, G. Development of floral organ identity: stories from the MADS house. **Current opinion in plant biology**, v. 4, n. 1, p. 75-85, 2001.
- TONIETTO, Â, et al. **Proteomic analysis of developing somatic embryos of *Coffea arabica***. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 30, n. 6, p. 1393-1399, 2012.
- TUDELA, D.; PRIMO-MILLO, E. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid transported from roots to shoots promotes leaf abscission in Cleopatra mandarin (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.) seedlings rehydrated after water stress. **Plant Physiology**, v. 100, n. 1, p. 131-137, 1992.
- TURCK, F.; FORNARA, F.; COUPLAND, G. Regulation and identity of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 573-594, 2008.
- TURNBULL, C. G. N. et al. Routes of ethephon uptake in pineapple (*Ananas comosus*) and reasons for failure of flower induction. **Journal of plant growth regulation**, v. 18, n. 4, p. 145-152, 1999.
- VAN MOURIK, S. et al. Continuous-time modeling of cell fate determination in Arabidopsis flowers. **BMC Systems Biology**, v. 4, n. 1, p. 101, 2010.
- VAN STADEN, J. The effect of emasculation on the endogenous cytokinin levels of Cymbidium flowers. **Scientia Horticulturae**, v.10, n.3, p. 277-284, 1979.
- VILAS BOAS, E. V. B. **1- MCP: um inibidor da ação do etileno**. In: Simpósio de controle de doenças de plantas: patologia pós-colheita de frutos e hortaliças. Lavras-MG. Palestras, 2002.
- VOINNET, O. Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 669-687, 2009.
- VOLTAN, R. B. Q; FAHL, J. I.; CARELLI, M. L. C. Diferenciação de gemas florais em cultivares de cafeeiro. **Coffee Science**, v. 6, n. 1, p. 36-43, 2011.
- WANG, H. L. V.; CHEKANOVA, J. A. Small RNAs: essential regulators of gene expression and defenses against environmental stresses in plants. **Wiley Interdisciplinary Reviews-Rna**, v. 7, n. 3, p. 356-381, 2016.
- WANG, J. et al. miRNA control of vegetative phase change in trees. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 2, p. e1002012, 2011.
- WANG, J.; CZECH, B.; WEIGEL, D. miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. **Cell**, v. 138, n. 4, p. 738-749, 2009.

- WANG, K.; LI, H.; ECKER, J. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **Plant Cell**, 14:S131-S151, 2002.
- WANG, Y. et al. Parsing the Regulatory Network between Small RNAs and Target Genes in Ethylene Pathway in Tomato. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 527, 2017.
- WATKINS, C. B. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 4, p. 389-409, 2006.
- WEIGEL, D. et al. LEAFY controls floral meristem identity in Arabidopsis. **Cell**, v. 69, n. 5, p. 843-859, 1992.
- WIGGE, P. A. et al. Integration of spatial and temporal information during floral induction in Arabidopsis. **Science**, v. 309, n. 5737, p. 1056-1059, 2005.
- WILKINSON, S.; DAVIES, W. J. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. **Plant, cell & environment**, v. 33, n. 4, p. 510-525, 2010.
- WU, G. et al. The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in Arabidopsis. **Cell**, v. 138, n. 4, p. 750-759, 2009.
- WU, G; POETHIG, R. S. Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. **Development**, v. 133, n. 18, p. 3539-3547, 2006.
- YAMAGUCHI, A.; ABE, M. Regulation of reproductive development by non-coding RNA in Arabidopsis: to flower or not to flower. **Journal of plant research**, v. 125, n. 6, p. 693-704, 2012.
- YAMAMOTO, K. et al. Delaying flower opening of cut roses by cis-propenylphosphonic acid. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 63, n. 1, p. 159-166, 1994.
- YANG, C. et al. MiR396-targeted SHORT VEGETATIVE PHASE is required to repress flowering and is related to the development of abnormal flower symptoms by the PHYLL1 effector. **Plant physiology**, p. pp. 00307.2015, 2015.
- YANG, F.; YU D. Overexpression of Arabidopsis MiR396 enhances drought tolerance in transgenic tobacco plants. **Acta Botanica Yunnanica**, v. 31, n. 5, p. 421-426, 2009.
- YANT, L. et al. Orchestration of the floral transition and floral development in Arabidopsis by the bifunctional transcription factor APETALA2. **The Plant Cell**, v. 22, n. 7, p. 2156-2170, 2010.
- YU, S. et al. Gibberellin regulates the Arabidopsis floral transition through miR156-targeted SQUAMOSA PROMOTER BINDING-LIKE transcription factors. **The Plant Cell**, v. 24, n. 8, p. 3320-3332, 2012.
- ZHANG, X. et al. Over-expression of sly-miR156a in tomato results in multiple vegetative and reproductive trait alterations and partial phenocopy of the sft mutant. **FEBS letters**, v. 585, n. 2, p. 435-439, 2011.
- ZHAO, Y. et al. NONCODE 2016: an informative and valuable data source of long non-coding RNAs. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D203D208, 2016.

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

ZUO, J. et al. Sculpting the maturation, softening and ethylene pathway: the influences of microRNAs on tomato fruits. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 7, 2012.