

IDENTIFICAÇÃO DE GENES COM EXPRESSÃO DIFERENCIAL EM FOLHAS DE CAFEIEIRO *Coffea canephora* E *Coffea arabica* SUBMETIDAS À DIFERENTES CONDIÇÕES DE ESTRESSE HÍDRICO

Pierre Marraccini², Gabriel Sergio Costa Alves³, Felipe Vinecky³, Luciana Pereira Freire⁴, Natalia Gomes Vieira⁴,
Humberto J O Ramos⁵, Luiz Gonzaga Esteves Vieira⁵, Sonia Elbelt⁶, Thomas Marques⁶, Gustavo Costa Rodrigues⁷,
Alan Carvalho Andrade⁸

¹ Trabalho financiado pela FINEP e Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – CBP&D-Café

² Pesquisador, Cirad UMR DAP Montpellier-França / LGM-NTBio, Embrapa Cenargen, Brasília-DF

³ Bolsista CNPq, LGM-NTBio, Embrapa Cenargen, Brasília-DF

⁴ Bolsista CBP&D-Café (FUNAPE), LGM-NTBio, Embrapa Cenargen, Brasília-DF

⁵ Pesquisador, IAPAR, Londrina-PR

⁶ Mestrado, Universidade Montpellier II, França

⁷ Pesquisador, Embrapa Cerrados, Planaltina-DF

⁸ Pesquisador, LGM-NTBio, Embrapa Cenargen, Brasília-DF, alan@cenargen.embrapa.br

RESUMO: Com a perspectiva de se estabelecer um programa de melhoramento genético por seleção assistida para a tolerância à seca em cafeeiro, o presente trabalho objetivou a identificação de genes candidatos para esta característica, por meio de análises integradas dos perfis de expressão gênica e protéica. Os resultados foram obtidos a partir de análises comparativas da expressão gênica e protéica de diferentes materiais genéticos (Tolerante *vs.* Sensível) assim como, diferentes regimes hídricos (Controle *vs.* Estresse hídrico). Os materiais genéticos estudados neste trabalho foram os clones de conillon 22 e 14 (*Coffea canephora*) e os cultivares Rubi e Iapar 59 (*Coffea arabica*). O estresse hídrico ($\Psi_{PD}=-3,0$ MPa) aplicado às plantas de conillon foi obtido em casa de vegetação e no caso de Arabica, foram avaliadas plantas adultas em condições de campo, sendo as folhas colhidas nos períodos diurno e noturno, onde o maior estresse hídrico observado foi de $\Psi_{PD}=-1,7$ MPa. Após a seleção dos genes candidatos por meio de diferentes estratégias, a expressão diferencial foi validada por qPCR. Os resultados mostram que muitos genes apresentaram uma queda de expressão com o estresse hídrico e esses genes, em geral, codificam proteínas implicadas na fotossíntese. Por outro lado, o estresse hídrico em cafeeiro, também induz a expressão de vários genes já descritos na literatura como essenciais à resposta das plantas à limitação de água, tais como *RD29*, *DREBA* e *NAC*, por exemplo. Já no caso de um gene que codifica para uma desidrina, os resultados obtidos neste trabalho, permitiram confirmar as expressões diferenciais previamente observadas em *C. canephora*, também em *C. arabica*. Contudo, este estudo revelou a importância de outros fatores no controle da expressão desses genes, tais como os ritmos circadianos (ciclos noite/dia), a idade e o “histórico” das plantas, sendo que estas observações, tornam ainda mais complexa, a interpretação dos dados de expressão diferencial, quando se utiliza material vegetal cultivado em condições de campo.

Palavras-chave: *Coffea*, estresse hídrico, expressão gênica, genes candidatos

IDENTIFICATION OF GENES DISPLAYING DIFFERENTIAL EXPRESSION IN LEAVES FROM PLANTS OF *Coffea canephora* AND *Coffea arabica* UNDER DIFFERENT CONDITIONS OF WATER STRESS

ABSTRACT: Aiming at the establishment of a breeding program based on marker-assisted selection for drought tolerance on coffee, the present work had as a goal, the identification of candidate genes for this trait by using an integrated approach (gene expression and proteomics). The data was obtained by comparing gene expression and protein profile of different genetic materials (Tolerant *vs.* Susceptible) as well as, under different conditions of water supply (Irrigated *vs.* Non-irrigated). In this work, the genetic materials studied were the conillon clones 22 and 14 (*Coffea canephora*) and the cultivars Rubi and Iapar 59 (*Coffea arabica*). The applied water stress ($\Psi_{PD}=-3,0$ MPa) to the conillon plants was achieved under green-house conditions and, in the case of Arabica, adult plants cultivated under field conditions were studied. In the later case, leaves were collected during day and night, and the most pronounced observed water-stress was of $\Psi_{PD}=-1,7$ MPa. After selection of candidate genes by different strategies, the expression was confirmed by qPCR analysis. The data obtained indicated that several genes displayed decreased expression upon water stress and usually these were encoding-genes of proteins involved in photosynthesis. On the other hand, the applied water stress on coffee plants also induced a set of genes such as *RD29*, *DREBA* and *NAC*, which have already been described in literature as genes involved in plant responses to drought. In the case of a Dehydrin encoding-gene, the data obtained in this work confirmed previously observed differential expression on *C. canephora*, on *C. arabica*, also. However, this study revealed the importance of other factors controlling the expression of these genes, such as the circadian clock, the age as well as the profile of the plants and, these observations make the interpretation of differential expression data obtained from field trials even more complex.

Key words: *Coffea*, water stress, gene expression, candidate genes

INTRODUÇÃO

Durante muitos anos, os programas de melhoramento genético do cafeeiro consistiram em identificar e utilizar a variabilidade natural existente no gênero *Coffea*, em esquemas de seleção, visando a criar novos híbridos adaptados às exigências dos cafeicultores (para os aspectos de produtividade) e dos consumidores (para os aspectos de qualidade da bebida). Em consequência da potencial elevação das temperaturas em função do aquecimento global, o desenvolvimento de novas variedades de café tolerantes à seca tornou-se uma das prioridades das pesquisas do café.

No gênero *Coffea*, já é conhecido que existe uma variabilidade genética importante para a tolerância à seca. Assim, as plantas do grupo Guineano e o subgrupo SG1 do grupo Congolese são consideradas, respectivamente, como muito resistentes e razoavelmente resistentes à seca enquanto as plantas do subgrupo SG2 do grupo Congolese são consideradas como muito sensíveis à seca (Montagnon & Leroy, 1993). Esta variabilidade genética em relação à tolerância à seca foi também observada nas populações de *C. canephora* cv. Conillon cultivadas no Brasil (INCAPER-ES) o que permitiu a seleção de clones tolerantes à seca (Ferrão et al., 2000) nos quais alguns já foram caracterizados fisiologicamente (Pinheiro et al., 2005, Praxedes et al., 2006).

O desenvolvimento das ferramentas moleculares geradas pelos avanços recentes na genômica do café (Lashermes et al., 2008) abre agora a possibilidade de estudar o determinismo genético da tolerância à seca e a identificação dos genes controlando essa característica. Com o conhecimento dos determinantes moleculares e genéticos da tolerância à seca no cafeeiro e a identificação de marcadores ligados à tolerância ao estresse hídrico, será possível a implantação de um programa por seleção assistida em cafeeiro, para se desenvolver novas variedades com uma melhor adaptação à seca.

Para se identificar os genes envolvidos na tolerância à seca em plantas de cafeeiro, diferentes estratégias foram seguidas no laboratório (Marraccini et al., 2007, 2008) tais como a identificação de genes candidatos (GC) via a análise *in silico* dos dados do projeto Genoma café (Vieira et al., 2006), a utilização de membranas de macroarranjos e por meio da busca de proteínas em géis de eletroforese 2D apresentando um acúmulo diferencial nas folhas de plantas de café submetidas a um estresse hídrico. Esse estudo apresenta os últimos resultados obtidos na busca desses GC que apresentam uma expressão diferencial em folhas das plantas de *C. canephora* e *C. arabica* cultivadas em diferentes condições de irrigação.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal:

Os clones tolerante (14) e sensível (22) à seca da variedade Conillon de *C. canephora* foram selecionados pelo INCAPER (Ferrão et al., 2000) e cultivados em casa de vegetação com irrigação (I) ou sem irrigação (NI = condição de estresse hídrico nas folhas com $\Psi_{PD} = -3.0$ MPa). Os cultivares Rubi e Iapar59 foram cultivados em campo (Embrapa Cerrados, Planaltina-DF) com (I: $\Psi_{PD} = -0.5$ MPa) o sem (NI: $\Psi_{PD} = -1.7$ MPa) irrigação por pivô central. Neste caso, o cultivar Iapar59 é considerado como mais tolerante à seca que o cultivar Rubi. Em todos os casos, os potenciais de base (Ψ_{PD} = “Pre-Dawn water potential”) foram medidos usando uma bomba de Scholander. Para todas as plantas, as folhas foram coletadas, congeladas no nitrogênio líquido e conservadas na temperatura de -80°C antes da extração dos RNA totais. As folhas coletadas no período noturno, foram colhidas ao mesmo tempo em que as medidas dos potenciais de base.

PCR quantitativo em tempo real:

As amostras de RNA total extraído de folhas foram submetidos a um tratamento enzimático com DNaseI-RNase “free”, e 1 μg de cada amostra foi utilizado para a transcrição reversa, com a enzima ImPromII (Promega), conforme recomendações do fabricante. O cDNA fita-simples sintetizado, foi diluído (1/50) e testado por qPCR usando pares de primers específicos dos genes candidatos. Esses primers foram desenhados usando as seqüências consenso de contigs disponíveis, na Base de Dados do Genoma Café (<https://alanine.cenargen.embrapa.br/cafEST>). As reações de qPCR foram realizadas com 1 μl de cDNA fita-simples em um volume final de 10 μl . Foi utilizado o fluoróforo SYBR-green (SYBRGreen qPCR Mix-UDG/ROX, Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante e as reações foram analisadas no aparelho ABI 7500-FAST (Applied Biosystems). Para cada amostra, os níveis da expressão foram normalizados com a expressão do gene *UBQ10* (www.sgn.cornell.edu SGN-U347154), o qual codifica para a ubiquitina. Os resultados obtidos foram analisados com o auxílio do programa SDS 1.3.1 (Applied Biosystems). Os níveis da expressão gênica foram apresentados na forma de quantificação relativa.

Análise proteômica:

A análise do perfil protéico foi realizada pela técnica de eletroforese bi-dimensional (2DE). As proteínas foram extraídas de folhas dos clones 14 e 22 de *C. canephora* pelo método modificado de fenol/SDS (Ramos et al., 2007) seguido pela eletroforese bi-dimensional. A primeira dimensão (focagem isoeétrica) foi realizada usando IPG Strips de 13cm (pH 3-10 ou pH 4-7) reidratados (20°C durante 12h) com 500-1000 μg de proteínas e analisados no sistema IPGphor (GE Healthcare). A segunda dimensão foi feita com géis SDS-PAGE (11%) usando o sistema Hoefer SE 600 Ruby system (GE Healthcare) sob 15mA/gel - 45mn e 30mA/gel -180mn numa temperatura de 12°C . Os géis foram

corados com Coomassie G-250 e R-350, digitalizados usando um scanner ImageScanner e analisados com o software ImageMaster 2D Platinum 6.0. As proteínas foram removidas manualmente dos géis, submetidas ao tratamento enzimático com tripsina e analisadas por espectrometria de massas, usando um espectrômetro Maldi-Tof/Tof (Autoflex, Bruker).

Identificação da proteína por Espectrometria de Massa:

As proteínas foram identificadas por PMF (“Peptide Mass Fingerprinting”) usando PiumsGUI2.2 e MS/MS Ion Search usando o software X!Tandem para a busca de proteínas similares nos bancos de dados do HarvEST e do Genoma Café (Vieira et al., 2006). Os pacotes Trans-Proteomic Pipeline (TPP) e Scaffold foram usados para analisar, validar, e armazenar os dados das proteínas identificadas. Os resultados da identificação foram verificados pela inspeção visual e por seqüenciamento *de novo*, usando o software PepSeq.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Expressão dos genes candidatos

Por meio das diferentes estratégias desenvolvidas no laboratório, foi possível selecionar genes candidatos (GC) para a tolerância à seca em cafeeiro (Marraccini et al., 2007, 2008; Vinecky et al., neste Simpósio). Para validar a expressão diferencial desses genes, experimentos de qPCR foram realizados. Com base nas respostas obtidas, foi possível classificar esses genes em diferentes grupos:

GC apresentando uma queda da expressão com o estresse hídrico:

A maior parte dos genes que seguem este tipo de resposta são principalmente aqueles que codificam proteínas envolvidas no funcionamento da fotossíntese. Por exemplo, redução na expressão pode ser observado para os genes da anidrase carbônica do cloroplasto (Figura 1A) que auxilia a RUBISCO na captura de CO₂, e das diferentes isoformas de OEE (“Oxygen Evolving Enhancer”, Figura 1B-D), proteínas estas, que participam ao processo da oxidação da água para produzir oxigênio em nível do fotossistema II. Para estes exemplos, as análises de géis 2DE mostraram que essa queda de expressão com o estresse hídrico é acompanhada também, pela queda no teor das proteínas correspondentes, como mostrado para a anidrase carbônica, por exemplo (Figura 2).

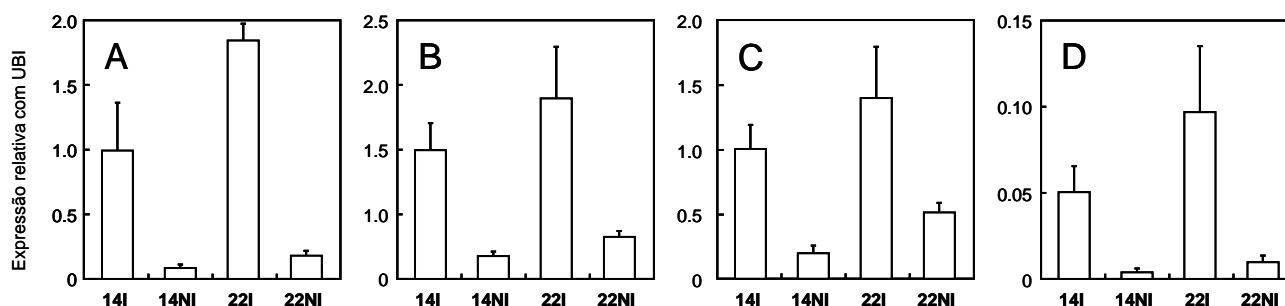


Figura 1: Expressão dos genes da anidrase carbônica do cloroplasto (A: contig #10308) e das proteínas OEE (B: contig #9409, C: contig #11493 e D: contig #6861) avaliada por qPCR. Os clones 14 e 22 de *C. canephora* e as condições de irrigação (I = plantas irrigadas; NI = plantas não irrigadas) são indicadas. Os resultados são apresentados em expressão relativa, normalizados à expressão do gene endógeno *UBI10*.

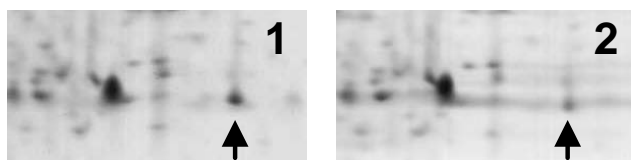


Figura 2: Expressão diferencial da anidrase carbônica do cloroplasto (identificada com as setas) analisada por eletroforese bidimensional (2DE) em folhas do clone 14 de *C. canephora* sem (1) o com (2) estresse hídrico.

GC apresentando um aumento da expressão com o estresse hídrico:

Neste grupo encontram-se os genes *RD29* (Figura 3A), *DREBA* (Figura 3B), *nsHb* (Figura 3C) e *NAC* (Figura 3D), por exemplo. Em plantas, os genes *DREBA* e *NAC* codificam para fatores de transcrição implicados na transdução do sinal de estresse, enquanto a função precisa da proteína *RD29* ainda não foi determinada (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki K, 2006). As hemoglobinas não-simbióticas (nomeadas nsHb) foram descritas como proteínas implicadas na sobrevivência ao estresse oxidativo particularmente em circunstâncias de hipoxia via neutralização do óxido nítrico (Dordas, 2009).

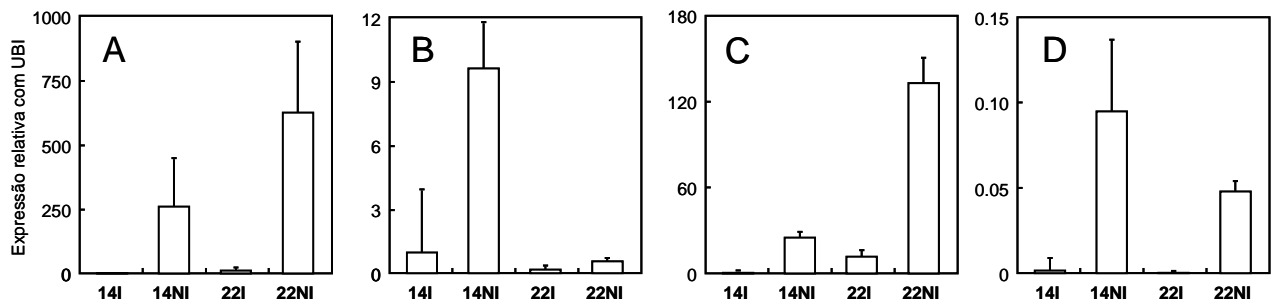


Figura 3: Expressão dos genes das proteínas RD29 (A: contig #8123), DREB (B: contig #5807), uma hemoglobina não simbiótica nsHb (C: contig #13239) e a proteína NAC (D: contig #16935) avaliada por qPCR. Os clones 14 e 22 de *C. canephora* e as condições de irrigação (I = plantas irrigadas; NI = plantas não irrigadas) são indicadas. Os resultados são apresentados em expressão relativa, normalizados à expressão do gene endógeno *UBI10*.

Análise preliminar de comparação da expressão de GC em folhas de *C. canephora* e *C. arabica*

Para se avaliar se os perfis de expressão desses GC são conservados entre as espécies de café, foi decidido analisar a expressão de alguns deles em folhas dos cultivares Rubi e Iapar59 de *C. arabica*, cultivados no campo, sob diferentes regimes hídricos. O estabelecimento do estresse hídrico nessas plantas foi acompanhado durante o período da seca (inverno) por meio de medidas dos potenciais hídricos (Figura 4). Essas medidas de potenciais de base (Ψ_{PD}) mostram que no período de maior estresse (2 = dia 05/09/08), o cultivar Rubi atingiu o potencial $\Psi_{PD} = -1.7$ MPa enquanto o potencial do cultivar Iapar59 estava superior ($\Psi_{PD} = -1.4$ MPa).

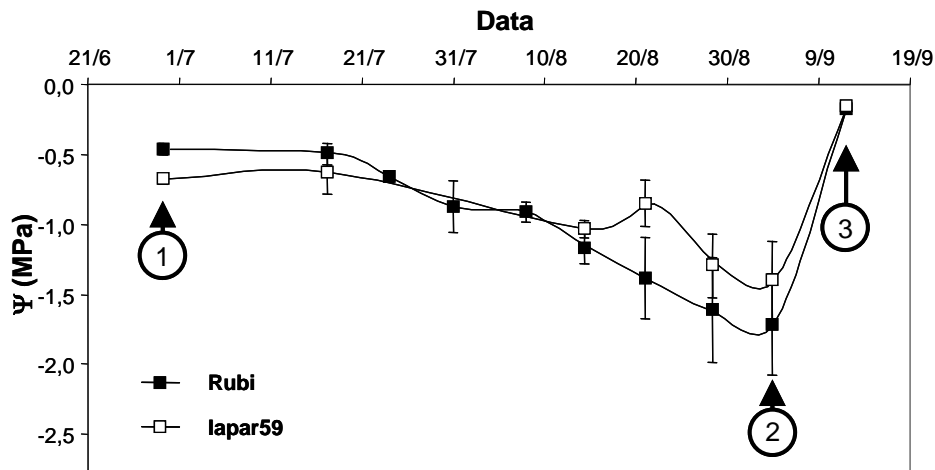


Figura 4: Evolução dos potenciais de base (Ψ_{PD}) nas folhas dos cultivares Rubi e Iapar59 de *C. arabica*, cultivados no campo, durante o inverno 2008 (do 30/06/08 até o 12/09/08). O retorno da irrigação (06/09/08) é indicado. Os pontos de referência para as análises de expressão são indicados com as setas: 1 (dia 30/06/08 antes da seca, plantas não estressadas), 2 (durante a seca: maior estresse hídrico; dia 05/09/08) e 3 (dia 12/09/08 após o retorno da irrigação).

As análises de expressão foram realizadas com folhas coletadas de *C. canephora* e *C. arabica*, como apresentado para um gene de desidrina (contig #18390), proteína que parece proteger as células contra os estresses osmóticos (Puhakainen et al., 2004). Nas folhas dos clones 14 e 22 de *C. canephora*, a expressão desse gene aumenta sob o estresse hídrico (Figura 5A). Isso pôde ser observado também, nas folhas colhidas durante o dia, para o Rubi de *C. arabica* (Figura 5B). Neste cultivar, a expressão do gene de desidrina baixou após o retorno da irrigação. Contudo, essas variações de expressão não foram observadas nas folhas do cultivar Iapar59 colhidas no mesmo período (durante o dia). Entretanto um aumento da expressão deste gene, pôde ser observada nos dois cultivares, quando a expressão foi testada em folhas colhidas durante a noite (Figura 5C).

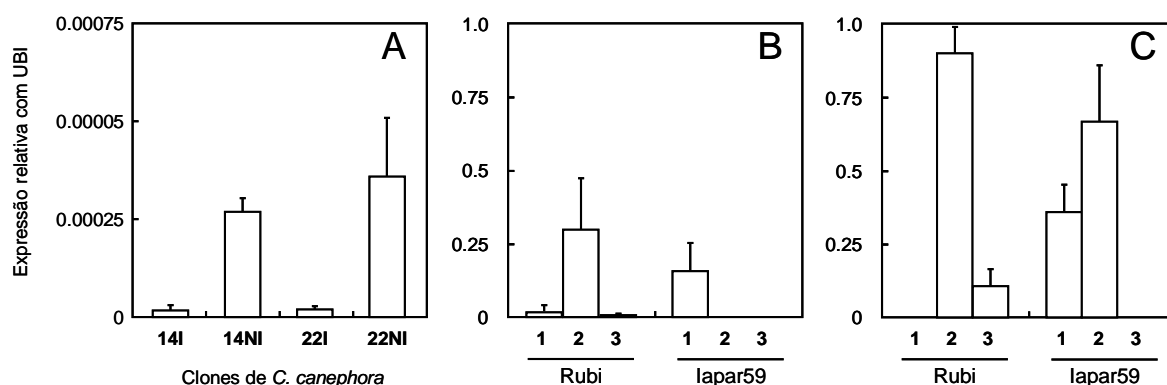


Figura 5: Expressão do gene da desidrina (contig #18390) em folhas dos clones 14 e 22 de *C. canephora* (A) cultivados em condições de irrigação (I = plantas irrigadas; NI = plantas não irrigadas) e em folhas dos cultivares Rubi e Iapar59 de *C. arabica* cultivados no campo. Para as plantas de *C. arabica*, as folhas foram colhidas em diferentes datas (1= 30/06/08, 2 = 05/09/08 e 3 = 12/09/08, ver Figura 4) e também durante o dia (B) ou durante a noite (C). Os resultados são apresentados em expressão relativa, normalizados à expressão do gene endógeno *UBI10*.

CONCLUSÕES

Os genes candidatos selecionados por meio das diferentes estratégias utilizadas no laboratório, foram validados com a técnica de qPCR, em folhas dos clones 14 e 22 de *C. canephora*. Essas análises mostram que muitos genes apresentaram uma queda de expressão com o estresse hídrico e esses genes, codificam proteínas implicadas na fotossíntese, tais como o da anidrase carbônica do cloroplasto, das proteínas OEE (“Oxygen Evolving Enhancer”) (este trabalho) mas também da pequena subunidade (RBCS) da Rubisco (ver Alves et al., neste Simpósio). Por outro lado, o estresse hídrico em cafeeiro, induz a expressão de vários genes já descritos na literatura como essenciais à resposta das plantas, tais como *RD29*, *DREBA* e *NAC*, por exemplo, que codificam para proteínas implicadas na transdução e na resposta das células à seca (Sreenivasulu et al., 2007). Para confirmar os perfis de expressão obtidos com os clones de *C. canephora* cultivados em casa de vegetação, foi analisada a expressão desses genes em plantas de *C. arabica* cultivadas no campo sob diferentes regimes hídricos. Como apresentado neste trabalho, para o gene da desidrina, os resultados obtidos, permitiram confirmar as expressões diferenciais previamente observadas em *C. canephora*, também em *C. arabica*. Contudo, este estudo preliminar revelou a importância de outros fatores no controle da expressão desses genes, tais como os ritmos circadianos (ciclos noite/dia), a idade e o “histórico” das plantas (resultados não apresentados), sendo que estas observações, tornam difícil a interpretação dos dados de expressão, utilizando-se material vegetal cultivado em condições de campo.

A clonagem e o seqüenciamento dos genes correspondentes a alguns dos GC identificados neste trabalho, em diferentes espécies, clones e cultivares de café que apresentam fenótipos contrastantes para a tolerância à seca, está sendo realizada com vistas à identificação de marcadores moleculares para essa característica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DORDAS, C. Non symbiotic hemoglobins and stress tolerance in plants. *Plant Science* 176: 433-440, 2009.
- FERRÃO, R.G.; FONSECA, A.F.A.; FERRÃO, M.A.G. Avaliação de clones elites de café Conilon em condição de estresse hídrico no estado do Espírito Santo. **I Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, Poços de Caldas-MG, CD-rom: 402-404, 2000.
- FISHER, R.A. On the interpretation of χ^2 from contingency tables, and the calculation of P. *J. Royal Stat. Soc.* 85:87-94, 1922.
- MARRACCINI, P.; DA SILVA, V.A.; ELBELT, S.; GUIMARÃES, B.L.S.; LOUREIRO, M.E.; DAMATTA, F.M.; FERRÃO, M.A.G.; DA FONSECA, A.F.A.; DA SILVA, F.R.; ANDRADE, A.C. Análise da expressão de genes candidatos para a tolerância à seca em folhas de clones de *Coffea canephora* var. conillon, caracterizados fisiologicamente. **V Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, Águas de Lindóia (SP)-Brasil, 2007.
- MARRACCINI, P.; RAMOS, H.; VIEIRA, L.G.E.; FERRÃO, M.A.G.; DA SILVA, F.R.; TAQUITA, J.A.; BLOCH JR., C.; ANDRADE, A.C. Study of drought tolerance mechanisms in coffee plants by an integrated analysis. **22th International Conference on Coffee Science**, Campinas-Brasil. B212, 2008.
- MONTAGNON, C.; LEROY, T. Réaction à la sécheresse de jeunes caféiers *Coffea canephora* de Côte-d’Ivoire appartenant à différents groupes génétiques. *Café Cacao Thé* 37: 179-189, 1993.

- PINHEIRO, H.A.; DAMATTA, F.M.; CHAVES, A.R.M.; LOUREIRO, M.E.; DUCATTI, C. Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora*. **Ann. Bot.** 96: 1001-108, 2005.
- PRAXEDES, S.C.; DAMATTA, F.M.; LOUREIRO, M.E.; FERRÃO, M.A.G.; CORDEIRO, A.T. Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. *kouillou*) leaves. **Environ. Exp. Bot.** 56: 263-273, 2005.
- PUHAKAINEN T, HESS MW, MAKELA P, SVENSSON J, HEINO P, PALVA ET. Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in Arabidopsis. **Plant Mol. Biol.** 54: 743-753, 2004.
- RAMOS, H.J.O.; SEIXAS, D.F.; PEREIRA, L.F.P.; CRUZ, L.M.; FUNGARO, M.H.; HUNGRIA, M.; OSAKU, C.; PETZL-ERLER, M.L.; AYUB, R.A.; PERALTA, M.; MARUR, C.J.; SOUZA, E.M.; VIEIRA, L.G.E.; PEDROSA, F.O. Análise proteômica do estresse hídrico em cafeeiro. **V Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**, Águas de Lindóia (SP)-Brasil, CD-rom, 2007.
- SREENIVASULU, N.; SOPORY, S.K.; KAVI KISHOR P.B. Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. **Gene** 388: 1-13, 2007.
- VIEIRA, L.G.E.; ANDRADE, A.C.; COLOMBO, C.A.; MORAES, A.A.H.; METHA, A.; OLIVEIRA, A.C.; LABATE, C.A.; MARINO, C.L.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; MONTE, D.C.; GIGLIOTI, E.; KIMURA, E.T.; ROMANO, E.; KURAMAE, E.E.; LEMOS, E.G.M.; ALMEIDA, E.R.P.; JORGE, E.C.; BARROS, E.V.S.A.; DA SILVA, F.R.; VINECKY, F.; SAWAZAKI, H.E.; DORRY, H.F.A.; CARRER, H.; ABREU, I.N.; BATISTA, J.A.N.; TEIXEIRA, J.B.; KITAJIMA, J.P.; XAVIER, K.G.; LIMA, L.M.; CAMARGO, L.E.A.; PEREIRA, L.F.P.; COUTINHO, L.L.; LEMOS, M.V.F.; ROMANO, M.R.; MACHADO, M.A.; COSTA, M.M.C.; GROSSI DE SÁ, M.F.; GOLDMAN, M.H.S.; FERRO, M.I.T.; TINOCO, M.L.P.; OLIVEIRA, M.C.; SLUYS, M.A.V.; SHIMIZU, M.S.; MALUF, M.P.; EIRA, M.T.S.; GUERREIRO FILHO, O.; ARRUDA, P.; MAZZAFERA, P.; MARIANI, P.D.S.C.; OLIVEIRA, R.L.; HARAKAVA, R.; BALBAO, S.F.; TSAI, S.M.; MAURO, S.M.Z.; SANTOS, S.N.; SIQUEIRA, W.J.; COSTA, G.G.L.; FORMIGHIERI, E.F.; CARAZZOLLE, M.F.; PEREIRA, G.A.G. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Braz. J. Plant Physiol.** 18: 95-108, 2006.
- YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annu. Rev. Plant Biol.** 57: 781-803, 2006.