

ANÁLISE DE EXPRESSÃO E POLIMORFISMO NUCLÉICOS DE GENES CANDIDATOS PARA A TOLERÂNCIA À SECA EM CAFEIEIRO¹

Luciana Pereira Freire²; Natália Gomes Vieira³; Felipe Vinecky⁴; Gabriel Sérgio Costa Alves⁵; Ingrid Gomes Renoldi Heimbeck⁶; Gustavo Costa Rodrigues⁷; Pierre Marraccini⁸; Alan Carvalho Andrade⁹

¹ Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café e com apoio da (o) FINEP, INCT/Café, CIRAD e Embrapa Café.

² Bolsista, M. Sc., Embrapa Café, Brasília – DF, luciana_freire@yahoo.com.br.

³ Mestranda, Bs, Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG.

⁴ Doutorando, M. Sc., Universidade de Brasília – UnB, Brasília – DF.

⁵ Doutorando, M. Sc., Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras – MG.

⁶ Bolsista, M. Sc., Embrapa Café, Brasília – DF.

⁷ Pesquisador, PhD, Embrapa Cerrados, Planaltina – DF.

⁸ Pesquisador, PhD, CIRAD UMR AGAP, Montpellier – FR; pierrem@cenargen.embrapa.br

⁹ Pesquisador, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF; alan@cenargen.embrapa.br.

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivos (i) analisar a expressão de genes candidatos (GC), que foram previamente identificados em plantas de *Coffea canephora*, e agora analisar a expressão em plantas de *Coffea arabica* cultivadas no campo e submetidas e não submetidas ao estresse hídrico e (ii) avaliar a diversidade genética de alguns GCs por meio da busca dos polimorfismos nucleicos. Os experimentos de expressão gênica foram realizados com os cultivares IAPAR59 (tolerantes à seca) e Rubi (sensível à seca) de *C. arabica* cultivados com e sem irrigação durante a estação seca. As folhas foram amostradas no ano de 2008 foram utilizadas para analisar a expressão de GCs por PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Em paralelo, seqüências gênicas correspondentes aos GC foram clonadas e seqüenciadas a partir do DNA genômico de diferentes espécies, clones e cultivares de cafeeiro. Os polimorfismos foram identificados e permitiram de definir os haplótipos encontrados nos genótipos estudados.

Palavras chave: *Coffea arabica*, estresse hídrico, expressão gênica, SNPs.

EXPRESSION AND NUCLEIC POLYMORPHISM ANALYSIS OF CANDIDATE GENES FOR DROUGHT TOLERANCE IN COFFEE

ABSTRACT: This study aimed to (i) analyze the expression of candidate genes (CG), that were previously identified in plants of *Coffea canephora*, and now analyze their expression in plants of *Coffea arabica* grown in the field and submitted and not submitted to water stress and (ii) evaluate the genetic diversity of some GCs through the searching for nucleic polymorphisms. The gene expression experiments were performed with IAPAR59 cultivars (drought tolerant) and Rubi (drought sensitive), both varieties of *C. arabica* that grown with and without irrigation during the dry season. The leaves were sampled during 2008 and were used to analyze the expression of sGC by real time quantitative PCR (qPCR). At the same time, gene sequences corresponding to the GC were cloned and sequenced from the genomic DNA of different species, clones and cultivars of coffee. The polymorphisms were identified and allowed the definition of the haplotypes found in the genotypes studied.

Key words: *Coffea arabica*, gene expression, SNPs, water stress.

INTRODUÇÃO

Os efeitos das mudanças climáticas, ocasionado pelo aquecimento global, poderão trazer mudanças nas regiões de cultivo do cafeeiro (Assad *et al.*, 2004). Fato esse que trará importantes conseqüências sociais (deslocamento de trabalhadores), econômicas e ecológicas. Períodos de seca afetam o desenvolvimento e a produtividade do cafeeiro. Em caso de seca severa, podem ocorrer danos à florada, ao desenvolvimento dos grãos, o que pode provocar o aborto dos frutos de café e a morte das plantas (DaMatta & Ramalho, 2006).

Assim no que tange à diversidade genética dos cultivares de café, estudos relatam que alguns cultivares apresentam comportamentos diferentes em relação à tolerância a seca, plantas de *C. canephora* var. Conilon sensíveis ou tolerantes à seca (Ferrão *et al.*, 2000, Fonseca *et al.*, 2004), foram analisadas ao nível fisiológico (DaMatta *et al.*, 2003, Lima *et al.*, 2002, Pinheiro *et al.*, 2004, 2005) e também utilizadas para identificar genes de respostas ao estresse hídrico (Andrade *et al.*, 2006, Vinecky *et al.*, 2008 Marraccini *et al.*, 2009). A diversidade genética para tolerância à seca é encontrada, embora de forma mais restrita, em espécie de *C. arabica* (Beining *et al.*, 2008). Assim, ocorre à

necessidade de analisar a diversidade nucleotídica *in vivo* de alguns genes candidatos (GC) por meio da identificação SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) em diferentes espécies, clones e cultivares de cafeeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimento de campo

Mudas dos cultivares Rubi (cultivar considerado sensível à seca) e IAPAR59 (I59: cultivar considerado tolerante a seca) de *C. arabica* foram plantadas em dezembro de 2007 no campo experimental da Embrapa Cerrados – DF e utilizadas para a validação da expressão dos genes candidatos. Exemplares de ambos cultivares foram submetidos à irrigação (I) e não irrigação (NI) durante todo o período de 2008 e 2009. Sob a condição (I), a água foi fornecida por aspersão. As plantas foram divididas em blocos de 1 até 6 (P1 à P6), com três pontos de colheita ao longo de cada ano. Neste trabalho utilizamos preferencialmente as folhas dos cultivares colhidas nos pontos de colheita (estação seca) P1 (06/2008), P2 (08/2008), para a análise de expressão por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) (7500 software v2. 0.1) (Figura1).

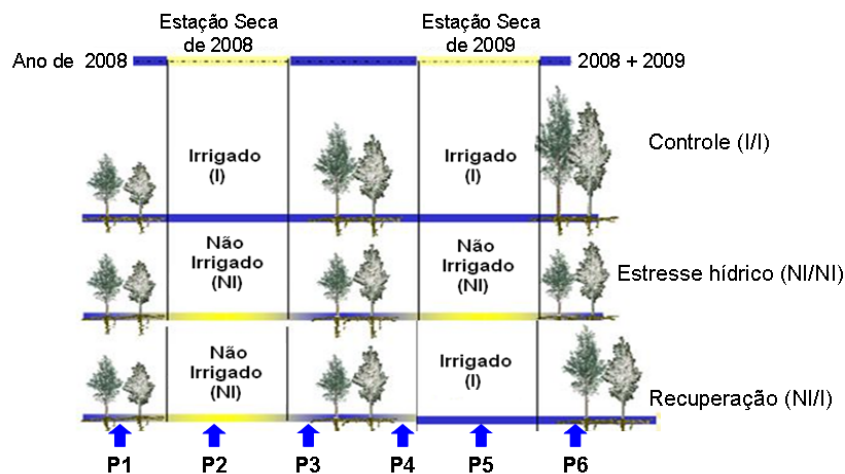


Figura 1 - Representação esquemática dos tratamentos hídricos aplicados nos cultivares de café. O ponto de colheita (P1) corresponde a plantas jovens, colhidas no final do período de chuva (maio 2008). O ponto de colheita (P2) corresponde às plantas colhidas no período de seca (agosto 2008). O ponto de colheita (P3) corresponde às plantas controles (período de chuva após o período de estresse Novembro 2008). O mesmo esquema foi repetido em 2009 (P4: abril 2009, P5 agosto 2009 e P6 fevereiro de 2010)

Procedimentos de amostragem

A análise do estresse hídrico nos pontos de colheita P2 e P5 foram realizadas por medições de potencial hídrico de antemanhã foliar (Ψ_{pd}) com o auxílio da bomba de pressão tipo Scholander. Para as análises de qPCR, as folhas dos cultivares de *C. arabica* cv. Rubi e I59 foram coletadas, entre as 10:00 e 12:00 horas, congeladas em N_2 líquido e armazenadas a $-80^\circ C$, para posterior extração de RNA total.

Desenho dos primers

Pares de *primers* utilizados para a análise de qPCR foram desenhados usando o programa "Primer Express 3.0" (Applied Biosystems) e as seqüências dos GC (contigs) foram produzidas pelo projeto genoma do café brasileiro (Mondego *et al.*, 2011).

Extração de RNA

A extração dos RNAs foi realizada utilizando-se o tampão de extração CONCERT® (Invitrogen). Cada extração foi realizada em triplicata. Para se avaliar a integridade das amostras extraídas, o RNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0.8% corado com Brometo de Etídio ($0.5 \mu g \cdot mL^{-1}$). A qualidade das amostras foi avaliada pelo espectrofotômetro ($DO_{260}/DO_{280} > 1.6-1.8$). Todas as amostras foram tratadas com o Kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega), de acordo com o protocolo do fabricante, para retirada dos vestígios de DNA genômico. A síntese reversa da primeira fita do DNA complementar (cDNA) foi feita a partir de $1 \mu g$ de RNA total utilizando o *primer* oligo dT₁₅, o kit SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen) (especificações do fabricante) e o termociclador modelo PTC-100 (MJ Research). As amostras de cDNA foram armazenadas a $-20^\circ C$.

Experimentos de qPCR

As amostras de cDNA sintetizadas foram diluídas (1 / 25 a 1 / 100) e testadas por qPCR utilizando pares de primers dos GCs que foram testados quanto à sua especificidade e eficiência (E). A qPCR foi realizada com $1 \mu L$ de cDNA em um volume final de $10 \mu L$ com SYBR fluorocromos verde (qPCR SYBRGreen Mix-UDG/ROX, Invitrogen)

de acordo com o fabricante e utilizando um aparelho FAST7500 (Applied Biosystems). Para cada amostra, os níveis de expressão foram padronizados com o gene endógeno (controle constitutivo) GAPDH (Barsalobres-Cavallari *et al.*, 2009), que codifica a enzima desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato. Os dados foram analisados com o programa 7500 Fast (v2.0.1). Os resultados de quantificação relativa foram obtidos usando a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$ com ΔC_T (amostra) = C_T (GC) - C_T (GAPDH) e $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ (amostra) - ΔC_T (calibrador). Nos experimentos apresentados, os valores de quantificação relativa do I56P1 foram usadas como calibrador interno.

Busca de SNPs

Amostras de DNAs genômicos (gDNA) de diferentes espécies e cultivares de *Coffea* foram testados (Tabela 1). Assim, foram usados cultivares comerciais de *C. arabica* sem introgressão recente de *C. canephora* (Typica, Bourbon, Mundo Novo e, Catuai), cultivares com introgressão do DNA genômico do Híbrido de Timor (e.g., IAPAR59), e também os clones 14 e 22 de *C. canephora* var. Conilon e espécies *C. racemosa* e *C. eugenioides*.

Amplificação das seqüências dos GC

Seqüências genômicas dos genes candidatos *CaRD29* (RD29) e *CaRD26* (NAC-RD26) (Tabela 1) foram amplificadas por reações de PCR convencional utilizando 6.25ng de gDNA, os primers específicos, e a *Taq* DNA polimerase de alta fidelidade (*Taq* Platinum High Fidelity, Invitrogen). As condições de PCR foram de 94°C-30 seg., 55°C-30s. e 72°C-4 min, durante 40 ciclos, seguido por uma extensão final de 10 min. a 72°C. Os produtos da PCR foram purificados por tratamento com "Wizard SV Gel e Clean-Up PCR System "(Promega), para posterior sequenciamento.

Primers	Seqüências dos Primers	Amplicon (pb)
RD29-F ⁽¹⁾	5'-TTTGTGAAACAGGCATGGAATC-3'	1707
RD29-R ⁽²⁾	5'-GAGCAAAAAGAATGGGAAAATCCT-3'	
RD26-F ⁽¹⁾	5'-AAAAAAAATGGGTGTTTCGAGAAACT-3'	1082
RD26-R ⁽²⁾	5'-CTACTCTTCATGGCCTAAAACCCAT-3'	
⁽¹⁾ M13 (-21)	5'-TGTAACACGACGGCCAGT-3'	
⁽²⁾ M13 (-40)	5'-GTTTCCAGTCACGAC-3'	

Tabela 1 - Primers utilizados para amplificar as seqüências genômicas dos genes candidatos. Para a busca dos SNPs, o sequenciamento dos produtos de PCR foi também realizado usando os primers descritos que foram adicionados na extremidade 5' das seqüências universais M13(-21)⁽¹⁾ e M13(-40)⁽²⁾.

Análise das seqüências

As seqüências nucleotídicas obtidas foram analisadas a partir do uso do programa "Sequencing analysis" (versão 5.2, Applied Biosystems). Após analisar as seqüências, foi realizado o alinhamento das mesmas por meio do programa ClustalW. Para traduzir as seqüências nucleotídicas encontradas foi utilizado o programa ExpASY.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Medidas dos potenciais hídricos

Por meio das medidas de potencial hídrico, foi possível observar que o estresse hídrico foi intenso no ano de 2008. A análise mostrou também que na condição NI, os valores de Ψ_{pd} para o cultivar I59 apareceram sempre menor que os valores de Ψ_{pd} para o cultivar Rubi, sugerindo que o cultivar I59 apresenta uma maior eficiência do uso da água que o cultivar Rubi (Tabela 2).

	2008	
	I	NI
I59	-0,38 ± 0,10	-0,80 ± 0,12
Rubi	-0,22 ± 0,07	-1,88 ± 0,36

Tabela 2 - Potencial hídrico foliar (Ψ_{pd}) medido durante a estação seca de 2008 nas folhas dos cultivares I59 e Rubi cultivados com (I) ou sem (NI) no período de seca. Os valores estão expressos em mega-Pascal (MPa).

Efeitos do estresse hídrico na expressão dos GCs: análise da expressão gênica dos genes *CaRD26* e *CaRD29*

Os experimentos qPCR foram feitos para analisar perfis de expressão dos GCs *CaRD29* e *CaRD26* previamente identificados para mostrar a expressão diferencial com o estresse hídrico nas folhas dos clones 14 (tolerante à seca) e 22 (suscetíveis à seca) de *C. canephora* var. conillon (Vinecky *et al.*, 2008; Andrade *et al.*, 2009, Marraccini *et al.*, 2009).

Para o ano 2008, os níveis de expressão do gene *CaRD26* (SGN-U645926, Mueller *et al.*, 2005; GT003652, Mondego *et al.*, 2011) nos cultivares I59 e Rubi apareceram relativamente baixos e iguais nos pontos P1 e P2-I (sem estresse hídrico). Para os dois cultivares, foi observado um aumento da expressão do gene *CaRD26* com estresse hídrico durante o período de seca (P2-NI) (Figura 2). Nesse caso, esse aumento pareceu ser maior nas folhas do Rubi (6.4 x) que em I59 (3.3x). (Figura 2). Assim, foram observados aumentos de expressão com o estresse hídrico para o gene *CaRD26* nas folhas de *C. arabica* como também descrito em *C. canephora*.

Para o gene *CaRD29* (SGN-U635478, GT660256), os resultados de qPCR mostram um aumento da expressão com o estresse hídrico nas folhas das plantas não irrigadas durante o período de seca (P2-NI) (Figura 2). Esse aumento foi muito maior para o cultivar Rubi (10.6 x) que para o cultivar I59 (2 x). Esse resultado poderia ser explicado pelo fato do estresse hídrico ser bastante severo no de ano 2008 (Tabela 2). Esses resultados confirmam os observados em *C. canephora*, que mostraram uma maior expressão do gene *CcRD29* em folhas do clone 22 (sensível a seca) que nas folhas do clone 14 (tolerante a seca) (Marraccini *et al.*, 2009).

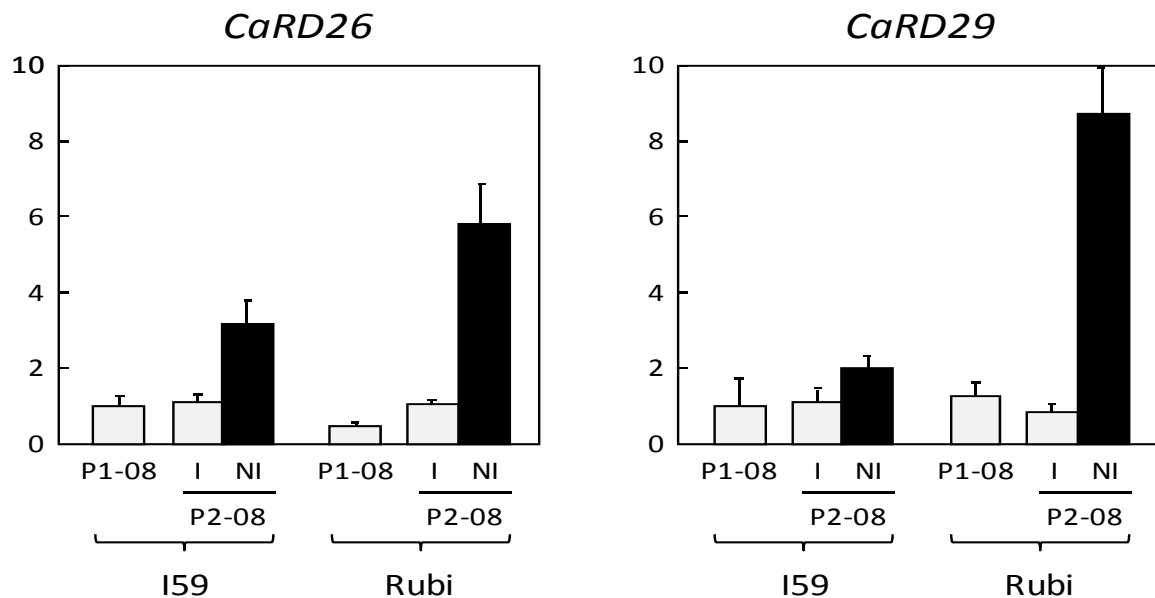


Figura 2 - Perfis de expressão dos genes candidatos *CaRD26* e *CaRD29* nas folhas das plantas colhidas durante os anos de 2008 a partir dos cultivares (I59: IAPAR59 e Rubi). Pontos de colheita (P) e os tratamentos (I: irrigado e NI: não irrigado) são indicados.

Busca de SNPs

A troca de aminoácidos Serina (hidrofílico neutro) – Arginina (hidrofílico básico), no SNP₄ do gene *CaRD26*, poderia acarretar mudanças na conformação e/ou na estrutura da proteína. Enquanto os SNP_{1,2,3,e,4} do gene *CaRD29* não conduzem a introduzir modificações de caráter hidrofóbico e hidrofílico. A estrutura da proteína pode não ser afetada com essas modificações. Sabe-se que proteína RD29 de cafeeiro possui domínio que são encontrados em proteínas de plantas induzidas com o estresse abiótico (Tabela 3).

		SNPs <i>CaRD26</i>							SNPs <i>CaRD29</i>						
		SNP ₁ G/C	SNP ₂ A/G	SNP ₃ C/T	SNP ₄ T/G	SNP ₅ G/A	SNP ₆ C/T	SNP ₇ G//A	SNP ₁ A/C	SNP ₂ G/A	SNP ₃ A/G	SNP ₄ G/A	SNP ₅ G/A	SNP ₆ T/C	
<i>CaRD26</i>		G	A	C	T	G	C	G	<i>CaRD29</i>	A	G	A	G	G	T
Genótipos															
<i>C. arabica</i>	M. Novo	NR	G A	T C	G T	G A	T C	G A	A C	G A	G C	G A	G G	T C	
	Catuai	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	C C	G G	G C	A A	G G	T T	
	Typica	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	C C	G G	G C	A A	G G	T T	
	Bourbon	NR	A C	C T	T C	A G	T C	G A	C C	G G	G C	A A	G G	T T	
	Rubi	NR	A C	T C	T C	G A	T C	G A	NR	NR	NR	NR	NR	NR	
I59	NR	A C	C T	T C	G A	T C	G A	C C	G G	G C	A A	G G	T T		
<i>C. canephora</i>	14		A	C	T	G	T	G	NR	NR	NR	NR	NR	NR	
	22	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	
<i>C. racemosa</i>	-	NR	A	T	T	A	T	G	A	A	C	G	G	T	
<i>C. eugenioides</i>	-	G	C	T	C	G	T	A	NR	NR	NR	NR	NR	NR	
Posição SNP		276	1022	1051	1063	1104	1108	1123	1459	1525	1558	1560	1604	1610	

Tabela 3 - SNPs dos genes *CaRD26* e *CaRD29*. A sequência de referência dos genes *CaRD26* e *CaRD29* são apresentadas na primeira linha da tabela. Para cada um dos genótipos, os nucleotídeos divergentes (SNPs) da sequência de referência são apresentados em vermelho e os nucleotídeos iguais são apresentados em amarelo. As posições dos SNPs nas sequências de referência são indicadas na última linha da tabela. NR: sequenciamentos não realizados.

CONCLUSÕES

As análises de expressão mostraram um aumento da expressão dos genes *CaRD26* e *CaRD29* com o estresse hídrico para os dois cultivares. Também, foi possível notar que esse aumento foi maior para o cultivar Rubi que para o cultivar I59. Esses resultados confirmam os observados em *C. canephora*. As análises das sequências gênicas obtidas a partir do sequenciamento dos “pools” referente aos genes *CaRD26* e *CaRD29* nos diferentes genótipos de *Coffea*, permitiu identificar a existência de poucos SNPs nas regiões codantes dos genes *CaRD26* (7 SNPs) e *CaRD29* (6 SNPs). Como as diferenças não parecem afetar drasticamente as sequências das proteínas correspondentes, isso indica que esses genes são extremamente conservados no gênero *Coffea*.

Trabalhos estão em andamento para finalizar a análise da diversidade genética dos genes *CaRD26* e *CaRD29* em diferentes acessos e cultivares de *Coffea sp.*. Em paralelo, estudos estão sendo realizados para analisar as sequências dos promotores desses genes (Alves *et al.*, nesse simpósio) afim de identificar outros polimorfismos que poderiam explicar as diferenças de níveis de expressão observadas entre os cultivares de *C. arabica* e os clones de *C. canephora*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, G.S.C.; FREIRE, L.P.; HEIMBECK, I.G.R.; VIEIRA, N.G.; VINECKY, F., MARRACCINI, P.; PAIVA, L.V.; ANDRADE, A.C. Identificação e análise de polimorfismos na região promotora do gene *DREB2A* em vários genótipos do gênero *Coffea*. In: VII SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, Araxá (Minas Gerais), Brazil, 2011.
- ANDRADE, A.C.; SILVA, V.A.; VINECKY, F.; BARBOSA, E.A.; DA SILVA, F.R.; LOUREIRO, M.E.; DAMATTA, F.R.; MARRACCINI, P.; FERRÃO, M.A.G.; DA FONSECA, A.A.; FERRÃO, R.G.; MELO, J.A.T.; SILVA, L.P.; BLOCH, Jr. C. Identification and functional characterization of genes involved in drought stress responses in coffee plants. In: 21TH INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, Montpellier, France, 2006.
- ASSAD, E.D.; PINTO, H.S.; ZULLO Jr, J.; ÁVILA, A.M.H. Impacto das mudanças climáticas no zoneamento agroclimático do café no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 39, 1057-1064, 2004.
- BARSALOBRES-CAVALLARI, C.F.; SEVERINO, F.E.; MALUF, M.P.; MAIA, I.G. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. **BMC**

Molecular Biology, v.10, n.1, p.1-11, 2009.

BEINING, A.; BURKHARDT, J.; FETENE, M. Water relations of Ethiopian wild coffee populations: genetic fixation and phenotypic plasticity. In: 22th INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, Campinas (São Paulo), Brazil, 2008.

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**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 55-81, Jan./Mar. 2006.

FERRÃO, R.G.; FONSECA, A.F.A.; SILVEIRA, J.S.M.; FERRÃO, M.A.G.; BRAGANÇA, S.M. EMCAPA 8141 - Robustão Capixaba, variedade clonal de café conilon tolerante à seca, desenvolvida para o estado do Espírito Santo. **Revista Ceres**, v. 273, p. 555-560, 2000.

DaMatta, F. M., Chaves, A.R.M., Pinheiro, H.A., Ducatti, C., Loureiro, M.E. Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. **Plant Science**. V.164, p. 111-117, 2003.

FONSECA, A.F.A.; FERRÃO, A.G.; FERRÃO, R.G.; FILHO, A.C.V. VOLPI, P.S.; ZUCATELI, F. Conilon Vitória - Incaper 8142: improved *Coffea canephora* var. Kouillou clone cultivar for the State Espírito Santo. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.4, p. 1-3, 2004.

LIMA, A.L.S.; DAMATTA, F.M.; PINHEIRO, H.A.; TOTOLA, M.R.; LOUREIRO, M.E. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water stress. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 239-247, May 2002.

MARRACCINI, P.; ALVES, G.S.C.; VINECKY, F.; FREIRE, L.P.; VIEIRA, N.G.; RAMOS, H.J.O.; VIEIRA, L.G.E.; ELBELT, S.; MARQUES, T.; RODRIGUES, G.C.; ANDRADE, A.C. Identificação de genes com expressão diferencial em folhas de cafeeiro *Coffea canephora* e *Coffea arabica* submetidas à diferentes condições de estresse hídrico. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, Vitória (Espírito Santo), Brazil, 2009.

MONDEGO, J.M.C.; VIDAL, R.O.; CARAZZOLLE, M.F.; TOKUDA, E.K.; PARIZZI, L.P.; COSTA, G.G.L.; PEREIRA, L.F.P.; ANDRADE, A.C.; COLOMBO, C.A.; VIEIRA, L.G.E.; PEREIRA, G.A.G.; AND BRAZILIAN COFFEE GENOME PROJECT CONSORTIUM. An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. **BMC Plant Biology**, n. 11, p. 30, 2011.

MUELLER, L.A.; SOLOW, T.H.; TAYLOR, N.; SKWARECKI, B.; BUELS, R.; BINNS, J.; LIN, C.; WRIGHT, M.H.; AHRENS, R.; WANG, Y.; HERBST, E.V.; KEYDER, E.R.; MENDA, N.; ZAMIR, D.; TANKSLEY, S.D. The SOL Genomics Network. A comparative resource for Solanaceae biology and beyond. **Plant Physiology**, n. 138, p. 1310-1317, 2005.

PINHEIRO, H.A.; DAMATTA, F.M.; CHAVES, A.M.; FONTES, E.P.B.; LOUREIRO, M.E. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. **Plant Science**, v. 167, p. 1307-1314, 2004.

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*. **Annals of Botany**, London, v. 96, n. 1, p. 101-108, July 2005.

VINECKY, F.; FREIRE, L.P.; VIEIRA, N.G.; ALVARENGA, M.O.; MARQUES, T.; MARRACCINI, P.; ANDRADE, A.C.; Molecular characterization of candidate genes involved in drought resistance in coffee plants. In: 22th INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, Campinas (São Paulo), Brazil, 2008.

VIEIRA, L.G.E.; ANDRADE, A.C.; COLOMBO, C.A.; ARAÚJO, A.H.; METHA, A.; OLIVEIRA, A.C.; LABATE, C.A.; MARINO, C.L.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; MONTE, D.C.; GIGLIOTI, É.A.; KIMURA, E.T.; ROMANO, E.; KURAMAE, E.E.; LEMOS, E.G.M.; ALMEIDA, E.R.P.; JORGE, E.C.; ALBUQUERQUE, E.V.S.; DA SILVA, F.R.; VINECKY, F.; SAWAZAKI, H.E.; EL DORRY, H.; 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-SA, M.F.; GOLDMAN, M.H.S.; FERRO, M.I.T.; TINOCO, M.L.P.; OLIVEIRA, M.C.; VANSLUYS, M.A.; SHIMIZU, M.M.; MALUF, M.P.; EIRA, M.T.S.; GUERREIRO FILHO, O.; ARRUDA, P.; MAZZAFERA, P.; MARIANI, P.D.S.C.; DE OLIVEIRA, R.L.B.C.; HARAKAVA, R.; FILIPPI, S.B.; TSAI, S.M.; DI 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. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 95-108, Mar. 2006.