

# ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE MANOSE 6 FOSFATO REDUTASE EM CAFEIROS SUBMETIDOS AO DÉFICIT HÍDRICO

Luciana Pereira Freire<sup>1</sup>, Pierre Marraccini<sup>2</sup>, Gustavo Costa Rodrigues<sup>3</sup>, Alan Carvalho Andrade<sup>4</sup>

(Recebido: 17 de dezembro de 2010; aceito: 12 de julho de 2012)

**RESUMO:** Os efeitos do déficit hídrico sobre a expressão do gene *CaM6PR*, codificando a manose-6-fosfato redutase, foram avaliados em cafeeiros em fase de formação das cultivares IAPAR59 (Villa Sarchi x híbrido de Timor HT832/2) e RUBI MG 1192 (Mundo Novo x Catuai) de *Coffea arabica*, consideradas respectivamente como tolerante e sensível ao estresse hídrico. As cultivares foram plantadas em dezembro de 2007 no campo experimental da Embrapa Cerrados – DF (CPAC) e cultivadas durante dois anos (2008 e 2009) com (I) e sem (NI) irrigação. Para cada ano, foram realizadas duas avaliações (P1, não estressado, durante a estação chuvosa e P2, estação seca). Para as duas cultivares, a expressão do gene *CaM6PR* foi medida em folhas por meio da técnica de PCR quantitativa, apresentou um forte aumento na estação seca para as plantas não irrigadas em comparação com as plantas irrigadas. Além disso, a expressão desse gene sempre foi maior no IAPAR59 que no RUBI MG 1192. Também, observou-se uma maior expressão desse gene no ano de 2008, quando comparada ao ano de 2009. Essa diferença poderia ser uma consequência direta dos níveis de estresse hídrico recebidos pelas plantas, já que as condições da seca em 2008 foram mais severas do que no ano de 2009. Assim, nesse trabalho, propõe-se o uso do gene *CaM6PR* como marcador molecular, para avaliar o nível de estresse das plantas cafeeiras submetidas ao déficit hídrico.

**Termos para indexação:** *Coffea arabica*, estresse abiótico, expressão gênica, genes candidatos, qPCR.

## ANALYSIS OF THE MANNOSE 6 PHOSPHATE REDUCTASE GENE EXPRESSION IN COFFEE TREES SUBMITTED TO WATER DEFICIT

**ABSTRACT:** The effects of water deficit on the gene *CaM6PR* expression, encoding mannose -6- phosphate reductase, were evaluated in coffee trees in the formation phase of coffee cultivars IAPAR59 ( Villa Sarchi x Timor hybrid HT832 / 2) and RUBI MG 1192 (Mundo Novo x Catuai ) of *Coffea arabica*, respectively regarded as tolerant and sensitive to water stress. The cultivars were planted in December 2007 in the experimental field of Embrapa Cerrados - DF ( CPAC ) and cultured for two years (2008 and 2009 ) with ( I) and without ( NI) irrigation. For each year two assessments were carried out (P1 , not stressed, during the rainy season and P2 , dry season ). For both cultivars, the *CaM6PR* gene expression measured in leaves through quantitative PCR, showed a strong increase in the dry season for non-irrigated plants when compared with irrigated plants. In addition, the expression of this gene was always greater in IAPAR59 than in RUBI MG 1192. Also, there was an increased expression of this gene in 2008 when compared to 2009. This difference could be a direct consequence of drought stress levels received by plants, since drought conditions in 2008 were more severe than in 2009. Thus, in this work, we propose the use of the *CaM6PR* gene as a molecular marker to evaluate the stress level of the coffee plants submitted to water deficit.

**Index terms:** *Coffea arabica*, abiotic stress, gene expression, gene candidates, qPCR.

## 1 INTRODUÇÃO

O cafeeiro é uma planta perene, pertencente à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea*. Entre as espécies cultivadas, *Coffea arabica* L. (Arábica) e *Coffea canephora* Pierre ex. A. Froehner (Robusta) são as mais importantes economicamente, representando aproximadamente e respectivamente

70% e 30% da produção comercial mundial (LASHERMES; ANDRADE; ETIENNE, 2008; LEROY et al., 2006). Contudo, a ocorrência do déficit hídrico influencia o desenvolvimento e a produção das plantas cafeeiras (DAMATTA; RAMALHO, 2006). Importantes consequências sociais, econômicas e ecológicas, como o deslocamento de trabalhadores para regiões

<sup>1</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Parque Estação Biológica/PqEB – Av. W5 Norte (final) – Cx. P. 02372 – 70.770-917 – Brasília – DF – freire\_luciana@yahoo.com.br

<sup>2</sup> CIRAD – UMR AGAP – Avenue d'Agropolis – F 34398 Montpellier – France – marraccini@cirad.fr

<sup>3</sup> Embrapa Informática Agropecuária – Cx.P. 6041 – 13083-886 – Campinas – SP – gustavo.rodrigues@embrapa.br

<sup>4</sup> Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Parque Estação Biológica/PqEB – Av. W5 Norte (final) – Cx. P. 02372 – 70.770-917 – Brasília – DF – alan.andrade@embrapa.br

diferentes das de origem e alterações no meio ambiente, podem ocorrer se nada for feito para diminuir ou amenizar os efeitos do déficit hídrico, que podem aumentar em função das mudanças climáticas. Estima-se que a geografia da produção agrícola no Brasil poderá mudar drasticamente nos próximos anos, mesmo com o aquecimento limitado a 1,5 °C até o final do século (ASSAD, 2009; ASSAD et al., 2004; INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION - ICO, 2009).

Atualmente, os estudos na área de melhoramento genético do cafeeiro, têm visado o desenvolvimento de novas cultivares tolerantes à seca. No entanto, se conhece relativamente pouco sobre como os genótipos de cafeeiros respondem ao estresse hídrico, particularmente sobre os genes envolvidos nessa resposta, e como eles são regulados ao nível transcricional.

Para identificar os genes envolvidos na tolerância à seca em plantas de cafeeiro, diferentes estratégias foram seguidas no laboratório (MARRACCINI et al., 2007, 2009, 2012) tais como a identificação de genes candidatos via análise *in silico* dos dados do projeto Genoma café principalmente a partir das bibliotecas de cDNA de plantas submetidas ao estresse hídrico (ANDRADE, 2007; VIEIRA et al., 2006; VINECKY et al., 2012). O gene da *CaM6PR* foi um dos genes previamente identificados em folhas de diferentes clones de *Coffea canephora* var. *conilon*, cultivados em condições controladas (casa de vegetação), que apresentou um aumento de expressão sob estresse hídrico (MARRACCINI et al., 2009; VINECKY et al., 2012). Nesse caso, a expressão desse gene foi mais alta nas folhas do clone 14 tolerante à seca que nas folhas do clone 22 sensível à seca (MARRACCINI et al., 2012). Esse gene codifica para a NADPH-manose dependente -6- fosfato redutase, enzima chave do metabolismo do manitol, açúcar amplamente distribuído entre as plantas e considerado osmoprotetor (BRAY, 1993; LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993). Assim, o acúmulo de osmólitos nas células das plantas resulta em um decréscimo no potencial osmótico e mantém a absorção de água, expressão de turgor da célula, o que contribui para a manutenção dos processos fisiológicos, como abertura estomática, fotossíntese e crescimento da

planta (ZHIFANG; LESCHER, 2003).

Mais recentemente, foi observada a ativação da via ABA, particularmente por meio do aumento da expressão dos genes *PYL*, codificando para os receptores de ABA e da queda de expressão dos genes, codificando para as proteínas fosfatase de tipo PP2C, nas plantas de *Arabidopsis* transformadas com o gene *M6PR* de aipo, sugerindo assim a ação do manitol como um sinal importante de controle da expressão dos genes implicados nas respostas aos estresses bióticos e abióticos (CHAN; GRUMET; LOESCHER, 2011).

Objetivou-se, neste trabalho, analisar a expressão do gene *M6PR* em cafeeiros em fase de formação das cultivares RUBI MG 1192 e IAPAR59 de *C. arabica*, consideradas respectivamente sensível e tolerante ao estresse hídrico. Para tanto, a expressão desse gene foi avaliada nas folhas dos cafeeiros, cultivados em campo, com (I) e sem (NI) irrigação, nas estações chuvosa e seca dos anos de 2008 e 2009.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

Mudas das cultivares RUBI MG 1192 (Mundo Novo x Catuaí) e IAPAR 59 (Villa Sarchi x híbrido de Timor HT832/2) de *C. arabica*, consideradas respectivamente como sensíveis e tolerantes à seca (RODRIGUES et al., 2010), foram plantadas em dezembro de 2007, no campo experimental da Embrapa Cerrados – DF (CPAC) e cultivadas durante dois anos (2008 e 2009) com (I) e sem (NI) irrigação. Para cada ano, foram realizadas duas avaliações chamadas de P1 (não estressado, durante a estação chuvosa) e P2 (estação seca). Para cada avaliação, as folhas foram colhidas pela manhã (entre 10 e 12 h), congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até serem utilizadas para a extração de RNA.

### Avaliação fisiológica das plantas

A avaliação do estresse hídrico na estação seca foi realizada por meio de medidas de potencial hídrico foliar de antemãhã ( $\Psi_{am}$ ) (determinado entre 4 e 6 h da madrugada), uma vez por semana, utilizando-se uma bomba de pressão tipo

Scholander. Para essas medidas, foram analisadas três plantas e coletadas três folhas de cada uma para os tratamentos irrigados (I) e não irrigados (NI), totalizando nove leituras por cultivar e por condição. As folhas encontravam-se no terceiro par dos ramos plagiotrópicos. Foram utilizadas para as medidas somente folhas totalmente expandidas e não danificadas. Para as extrações de RNA, o mesmo protocolo de amostragem (3 repetições biológicas de 3 folhas) foi seguido. As folhas foram congeladas no campo com nitrogênio líquido e armazenadas em  $-80^{\circ}\text{C}$ , antes de serem pulverizadas.

### Extração de RNA

As repetições biológicas das folhas foram pulverizadas independentemente com nitrogênio líquido e os RNAs totais foram extraídos como descrito a seguir. Aproximadamente 10 mg do material pulverizado foi misturado com 500  $\mu\text{L}$  de tampão “Plant RNA Purification Reagent” (PRPR) (Invitrogen), incubado por 5 min. à temperatura ambiente e centrifugada (10 min.  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $16100 \times g$ ). A fase líquida foi recolhida e misturada com 100  $\mu\text{L}$  de 5M NaCl e 300  $\mu\text{L}$  de clorofórmio. Após homogeneização, a solução foi centrifugada com descrito previamente para recolher a fase superior que foi adicionada de 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Após precipitação (30 min. temperatura ambiente), a solução foi centrifugada novamente em solução etanol 70%, para retirar o excesso de sais e depois colocada em banho seco a  $37^{\circ}\text{C}$  até secar. Em seguida, o pélete contendo os RNAs totais foi ressuscitado em 20  $\mu\text{L}$  de água. A qualidade dos RNAs foi verificada por eletroforese em gel de agarose e os RNAs foram quantificados por espectrofotometria (Nanodrop® Espectrophotometer ND-1000).

### Tratamento com DNase e Transcriptase Reversa RT

A eliminação do DNA genômico contaminante, foi realizada por tratamento das amostras de RNAs com RQ1 RNase-free DNase, de acordo com as instruções do fabricante (Promega). A ausência de DNA genômico e a qualidade dos RNAs extraídos foram verificados com eletroforese em gel de agarose. A reação da

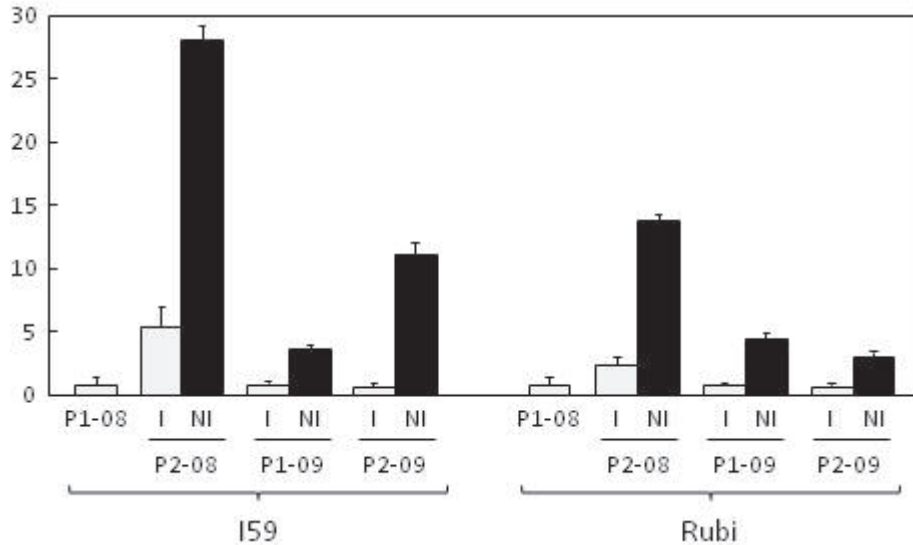
síntese reversa foi realizada usando 1  $\mu\text{g}$  de RNA total, correspondendo a uma mistura (0.33  $\mu\text{g}$ ) de RNA total de cada uma das repetições biológicas. Depois, o RNA total foi incubado com o oligo dT<sub>15</sub> durante 50 min a  $42^{\circ}\text{C}$  com a enzima SuperScript™ II Reverse Transcriptase de acordo com as recomendações do fornecedor (Invitrogen). Após a inativação da enzima ( $72^{\circ}\text{C}$  durante 15 min), as amostras de cDNA foram conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

As reações de PCR quantitativo foram realizadas usando as amostras de cDNA preparadas previamente utilizando-se o protocolo recomendado para o uso do 7500 Fast Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems). Os cDNAs foram diluídos (1/50), e testados em triplicatas com o gene controle endógeno (*GAPDH*), usando os primers específicos GAPDH-F (5'-TTGAAGGGCGGTGCAA3') e GAPDH-R (5'-AACATGGGTGCATCCTTGCT3') previamente descritos por Barsalobres-Cavallari et al. (2009). Para o gene *CaM6PR* (*M6PR* de *C. arabica*), os primers M6FR-F (5'-ACGAGTAAAGGGCTGGCTAAGA-3') e M6FR-R (5'-TTCCAAACGTCCATCCCTT-3') foram desenhados a partir da sequência do EST GT648734 (número de acesso no GenBank), do Projeto Genoma Café (VIEIRA et al., 2006) e utilizando a sequência e o programa “Primer Express 3.0” (Applied Biosystems). A reação de qPCR foi realizada em um volume final de 10  $\mu\text{L}$  com 1  $\mu\text{L}$  de cDNA diluído (1/50), 0,2  $\mu\text{M}$  (concentração final) de cada primers na presença de tampão 1 x SYBRGreen qPCR Mix-UDG/ROX (Invitrogen). Realizou-se um tratamento prévio com UDGase (2 min -  $50^{\circ}\text{C}$  e 5 min. -  $95^{\circ}\text{C}$ ) seguidos de 40 ciclos (de amplificação de 3 seg. -  $95^{\circ}\text{C}$ , 30 seg. -  $60^{\circ}\text{C}$ ). Os dados foram analisados no programa 7500 Fast Software (software v2.0.1). A normalização foi realizada utilizando-se a equação  $\Delta C_T = C_T$  (gene alvo) -  $C_T$  (controle endógeno). A calibração foi determinada pela fórmula  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$  (amostra) -  $\Delta C_T$  (calibrador). O calibrador interno usado como base para padronizar os resultados de expressão foi a amostra I59-P1 (Figura 1).

A quantificação relativa foi obtida

**FIGURA 1** – Perfis de expressão do gene *CaM6PR*, em folhas das cultivares de *Coffea arabica* IAPAR59 (I59) e RUBI MG 1192 (Rubi). As avaliações foram realizadas na estação chuvosa (P1) e na estação seca nos anos de 2008 (08) e 2009 (09) com (I) ou sem (NI) irrigação. As cultivares e os tratamentos são indicados. Resultados (em triplicado) de qPCR são expressos em quantificação relativa normalizada com a expressão do gene endógeno (referência) GAPDH. Para cada ano, os níveis de expressão obtidos com a amostra I59-P1 foram usados como o calibrador interno.



pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . Os valores de expressão correspondem à média de 3 repetições técnicas com o desvio padrão. Vale ressaltar que foi utilizada como calibrador a amostra P1 (não estressado, durante a estação chuvosa).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Análises fisiológicas das plantas

As avaliações do potencial hídrico foliar de antemanhã ( $\Psi_{am}$ ) indicaram que os valores desses potenciais em condição de estresse hídrico (NI: não irrigado) sempre foram mais negativos para a cultivar RUBI MG 1192 que para a cultivar IAPAR59 (TABELA 1).

Essas medidas também evidenciaram que o déficit hídrico, nas plantas não irrigadas (P2-NI) do ano 2008 foi mais severo que no ano 2009, com valores de potenciais mais negativos para as duas cultivares em 2008. Por outro lado, observaram-se valores de potenciais semelhantes para as plantas irrigadas (P2-I), durante o período de seca ( $\pm -0,2$  MPa). De acordo com Pinheiro et

al. (2005), os mecanismos fisiológicos associados à tolerância ao déficit hídrico da espécie de *C. canephora* var. *conilon* parecem estar relacionados à sensibilidade estomática induzida pelo déficit hídrico no solo. Estudos também têm confirmado que plantas adaptadas à seca e às condições de déficit hídrico são caracterizadas por um sistema radicular mais profundo e vigoroso (PINHEIRO et al., 2005). De acordo com Taiz e Zeiger (2004), sob condições normais de crescimento a parte aérea da planta funciona como o principal dreno de fotoassimilados, contudo, quando a planta está submetida ao déficit hídrico, algumas delas desenvolvem raízes mais profundas que passam a receber uma maior proporção de assimilados, uma vez que a demanda energética da parte aérea é diminuída devido à inibição da expansão foliar. Assim, sob estresse hídrico moderado, a inversão na relação fonte-dreno favorece o crescimento do sistema radicular que, assim, aprofunda suas raízes rumo às camadas mais inferiores e úmidas do solo.

Comparando-se o sistema radicular das



**TABELA 1** – Valores dos potenciais hídricos foliares ( $\Psi_{am}$ ) medidos durante a estação seca (P2) de 2008 e 2009 em folhas das cultivares IAPAR59 e RUBI MG 1192 de *Coffea arabica*, cultivadas com (I) ou sem (NI) irrigação. Os valores estão expressos em mega-Pascal (MPa)  $\pm$  desvio padrão.

	2008		2009	
	P2-I	P2-NI	P2-I	P2-NI
IAPAR59	-0,38 $\pm$ 0,10	-0,80 $\pm$ 0,12	-0,12 $\pm$ 0,00	-0,59 $\pm$ 0,03
RUBI	-0,22 $\pm$ 0,07	-1,88 $\pm$ 0,36	-0,11 $\pm$ 0,00	-1,20 $\pm$ 0,16

cultivares RUBI MG 1192 e IAPAR59 das plantas analisadas com as medidas de potenciais e os dados de fluxo de seiva, Rodrigues et al. (2010) observaram uma maior taxa de eficiência do uso da água (WUE, “water use efficiency”) para a cultivar IAPAR59 do que para a cultivar RUBI MG 1192. Esses resultados foram também confirmados com as medidas de discriminação isotópica de  $\Delta^{13}C$ , em folhas.

Com as medidas de potenciais descritas neste trabalho, os resultados demonstram que as plantas jovens da cultivar IAPAR59 dispõem de uma maior capacidade para reduzir as perdas de água que a cultivar RUBI MG 1192, o que torna a cultivar IAPAR59 mais tolerante à seca (RODRIGUES et al., 2010). Isso poderia estar relacionado ao acúmulo nas folhas de manitol ou de outros açúcares, pois esses compostos são conhecidos por agir como osmoprotetores contra os danos ocorridos durante os períodos de estresse como, por exemplo, à seca (BOHNERT; JENSEN, 1996).

#### Análise de PCR quantitativo, em tempo real (qPCR)

No ano 2008, as duas cultivares apresentaram níveis idênticos de expressão do gene *CaM6PR* na estação chuvosa. Para a avaliação realizada nas plantas irrigadas durante a estação seca, os níveis de expressão do gene *CaM6PR* foram mais elevados quando comparadas as avaliações realizadas nas plantas, durante a estação chuvosa (FIGURA 1). Nas condições de estresse hídrico das plantas não irrigadas (P2-NI), um aumento da expressão do gene *CaM6PR* foi observado para as duas cultivares (5,5 x). Independentemente das condições de irrigação, a expressão do gene *CaM6FR* foi sempre maior (2 x) nas folhas da

cultivar IAPAR59 do que nas folhas da cultivar RUBI MG 1192.

Durante a estação chuvosa do ano 2009, foram observados níveis menores de expressão do gene *CaM6FR* para as duas cultivares comparados com as expressões medidas durante o período de seca de 2008. Durante a estação de seca do ano 2009, os níveis de expressão do gene *CaM6FR* sempre foram maiores para as duas cultivares nas folhas das plantas não irrigadas (NI), em comparação com as folhas irrigadas (I). Por essas análises é possível observar que o aumento de expressão do gene *CaM6FR*, no período seco foi maior nas folhas da cultivar IAPAR59 do que nas folhas da cultivar RUBI MG 1192. Para as duas cultivares, a comparação dos resultados dos dois anos indica que os níveis de expressão do gene *CaM6PR* foram mais baixos no ano 2009 que no ano anterior. Mesmo assim, e durante os dois anos do estudo, o aumento da expressão desse gene durante a seca sempre foi maior nas folhas da cultivar IAPAR59 do que nas folhas da cultivar RUBI MG 1192.

De acordo com os resultados, esses aumentos de expressão do gene *CaM6PR* na estação seca nas plantas de *C. arabica*, cultivadas em campo, são semelhantes às variações de expressão previamente descritas para o mesmo gene nas plantas *C. canephora*, cultivadas casa de vegetação (MARRACCINI et al., 2012). Também, as diferenças do nível de expressão do gene *CaM6FR*, nos dois anos do experimento, podem ser explicadas em parte com as variações do nível de estresse recebidas pelas plantas e avaliadas por meio das medidas dos potenciais hídricos. Nesse caso, os níveis de expressão do gene *CaM6PR*, observados nas duas cultivares de *C. arabica*, foram maiores durante a seca severa de 2008 do

que durante a seca leve de 2009, corroborando perfeitamente com a hipótese de influência direta do estresse hídrico sobre o nível de resposta desse gene.

Levando-se em consideração o experimento prévio realizado com as cultivares *C. canephora* (MARRACCINI et al., 2012), e ressaltando que, nesse estudo, as cultivares estudadas são de *C. arabica*, o gene *CaM6FR* apresentou expressão maior com estresse hídrico na cultivar IAPAR59 de *C. arabica* e no clone 14 de *C. canephora* (considerados como tolerantes à seca), do que na cultivar RUBI MG 1192 de *C. arabica* e no clone 22 de *C. canephora* (considerados como sensíveis à seca). Como a manose-6-fosfato redutase controla a síntese de manitol, a sua maior expressão em condição de estresse hídrico pode estar diretamente ligada à maior tolerância dessas plantas ao estresse hídrico. De acordo com estudos realizados por Zhifang e Loeschler (2003), plantas transgênicas que acumulam manitol parecem ser mais tolerantes ao estresse salino. Praxedes et al. (2006) não citaram participação dos açúcares no processo da tolerância à seca nas folhas de *C. canephora* var. *conilon*. Entretanto, os resultados do estudo para o gene *CaM6FR*, indicam uma alta expressão desse gene com a seca na cultivar IAPAR59, sugerindo que seria interessante avaliar os teores do manitol nas folhas das plantas I e NI das cultivares IAPAR59 e RUBI MG 1192, analisadas neste estudo.

#### 4 CONCLUSÕES

De fato, a expressão do gene *CaM6FR* foi maior nas folhas da cultivar IAPAR59 tolerante à seca, quando comparada às folhas da cultivar RUBI, sensível à seca, o que sugere que a síntese de manitol pode estar implicada nos mecanismos de tolerância à seca em cafeeiro. Independentemente da cultivar analisada, observamos que a expressão do gene *CaM6FR* foi maior na seca severa. Sendo assim, podemos sugerir, a partir dos resultados obtidos, a utilização do gene *CaM6FR* como marcador molecular para avaliar o nível de estresse hídrico nas plantas de cafeeiro submetidas ao déficit hídrico.

*Coffee Science*, Lavras, v. 8, n. 1, p. 17-23, jan./mar. 2013

#### 5 AGRADECIMENTOS

À Financiadora de Estudos e Projetos FINEP, ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – (CBP&D-Café), ao CIRAD (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Montpellier - França), à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – (CENARGEN) e à Universidade Federal de Lavras (UFLA).

#### 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, A. C. Projeto genoma café: uma ferramenta para acelerar o melhoramento de variedades. **Irrigação e Tecnologia Moderna**, Belo Horizonte, v. 73, p. 19-20, mar. 2007.
- ASSAD, E. D. **Aquecimento global pode mudar o mapa de produção**. Disponível em: <<http://www22.sede.embrapa.br/cafe/noticias/n30102009.html>>. Acesso em: 17 out. 2009.
- ASSAD, E. D. et al. Impacto das mudanças climáticas no zoneamento agroclimático do café no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 11, p. 1057-1064, nov. 2004.
- BARSALOBRES-CAVALLARI, C. F. et al. Identification of suitable internal control genes for expression studies in *Coffea arabica* under different experimental conditions. **BMC Molecular Biology**, Bethesda, v. 10, n. 1, p. 1-11, Jan. 2009.
- BOHNERT, H. J.; JENSEN, R. G. Strategies for engineering water stress tolerance in plants. **Trends Biotech**, Arizona, v. 14, n. 3, p. 89-97, Mar. 1996.
- BRAY, E. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, Washington, v. 103, n. 4, p. 1035-1040, Dec. 1993.
- CHAN, Z.; GRUMET, R.; LOESCHER, W. Global gene expression analysis of transgenic, mannitol-producing, and salt-tolerant *Arabidopsis thaliana* indicates widespread changes in abiotic and biotic stress-related genes. **Journal of Experimental Botany**, Elmsford, v. 62, n. 14, p. 4787-4803, Aug. 2011.

- DAMATTA, F. M.; RAMALHO, J. C. Impact 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, 2006.
- INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **As estatísticas do comércio do café**. Disponível em: <<http://www.ico.org>>. Acesso em: 25 nov. 2009.
- LASHERMES, P.; ANDRADE, A. C.; ETIENNE, H. Genomics of coffee, one of the world's largest traded commodities. **Genomics of Tropical Crop Plants**, New York, v. 1, n. 1, p. 203-226, May 2008.
- LEPRINCE, O.; HENDRY, G. A. F.; MCKERSIE, B. D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Ottawa, v. 3, n. 4, p. 231-246, July 1993.
- LEROY, T. et al. Genetics of coffee quality. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 229-242, Jan./Mar. 2006.
- MARRACCINI, P. et al. Análise da expressão de genes candidatos para a tolerância a seca em folhas de clones de *Coffea canephora* var. conillon, caracterizados fisiologicamente. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 5., 2007, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia, 2007. 1 CD-ROM.
- \_\_\_\_\_. Differentially expressed genes and proteins upon drought acclimation in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 63, n. 11, p. 4191-4212. Mar. 2012.
- \_\_\_\_\_. 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, 2009, Vitória. **Anais...** Vitória: Consórcio Pesquisa Café, 2009. 1 CD-ROM.
- PINHEIRO, H. A. et al. 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.
- PRAXEDES, S. C. et al. Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. *kouillou*) leaves. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 3, p. 263-273, July 2006.
- RODRIGUES, G. C. et al. Preliminary results on phenotypic plasticity of coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi and Iapar59) plants in response to water constraint under field conditions. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 23., 2010, Bali. **Proceedings...** Bali, 2010. 1 CD-ROM.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 715 p.
- VIEIRA, L. G. E. et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 1, p. 95-108, Mar. 2006.
- VINECKY, F.; SILVA, F. R. da; ANDRADE, A. C. Análise in silico das bibliotecas de cDNA SH2 e SH3 para a identificação de genes responsivos à seca em cafeeiro. **Coffee Science**, Lavras, v. 7, n. 1, p. 1-19, 2012.
- ZHIFANG, G.; LOESCHER, W. H. Expression of a celery mannose 6-phosphate reductase in *Arabidopsis thaliana* enhances salt tolerance and induces biosynthesis of both mannitol and a glucosyl-mannitol dimer. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 26, p. 275-283, Feb. 2003.