

EXPRESSÃO DO GENE *RBCS1* EM CAFÉ: *COFFEA* ORTÓLOGOS, *COFFEA ARABICA* HOMEÓLOGOS E VARIABILIDADE DE EXPRESSÃO ENTRE GENOTIPOS E SOB ESTRESSE HÍDRICO¹

Natália Gomes Vieira²; Luciana Pereira Freire³; Gabriel Sérgio Costa Alves⁴; Felipe Vinecky⁵; Sonia Elbelt⁶; Humberto Josué de Oliveira Ramos⁷; Christophe Montagnon⁸; Luiz Gonzaga Esteves Vieira⁹; Thierry Leroy¹⁰; David Pot¹⁰; Vânia Aparecida Silva¹¹; Gustavo Costa Rodrigues¹²; Pierre Marraccini¹⁰; Alan Carvalho Andrade¹³

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

² Mestranda, Bióloga, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (LGM-NTBio), Brasília-DF

³ Bolsista, M.Sc., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (LGM-NTBio), Brasília-DF

⁴ Doutorando, M.Sc., UFLA – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (LGM-NTBio), Brasília-DF

⁵ Doutorando, M.Sc., UnB – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (LGM-NTBio), Brasília-DF

⁶ Mestranda, Bióloga, Universidade Montpellier I- Cirad, Montpellier-FR

⁷ Pesquisador, PhD, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG

⁸ Pesquisador, PhD, CIRAD UMR RPB, Montpellier-FR

⁹ Pesquisador, PhD, IAPAR / LBI-AMG, Londrina-PR

¹⁰ Pesquisador, PhD, CIRAD UMR AGAP, Montpellier-FR

¹¹ Pesquisador, PhD, EPAMIG/URESM, Lavras-MG

¹² Pesquisador, PhD, Embrapa Cerrados, Planaltina-DF

¹³ Pesquisador, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (LGM-NTBio), Brasília-DF

RESUMO: A expressão do gene *RBCS1* foi analisada no contexto da alopoliploidia de *C. arabica*. O nosso estudo revelou a existência de dois genes *RBCS1* homeólogos em *C. arabica*: um oriundo do sub-genoma de *C. canephora* (chamado *CaCc*) e o outro oriundo do sub-genoma de *C. eugenioides* (chamado *CaCe*). Usando *primers* específicos de cada homeólogos, os estudos da expressão revelaram que *CaCe* se expressava em *C. eugenioides* e *C. arabica* mas não em *C. canephora*. Por outro lado, *CaCc* se expressava em *C. canephora* mas estava quase silenciado em genótipos não-introgressados (“puros”) de *C. arabica*. Entretanto, uma expressão de *CaCc* foi observada na maioria dos cultivares de *C. arabica* introgressados com genoma de *C. canephora*. Para ambas as espécies, o estresse hídrico levou a uma diminuição importante na abundância dos transcritos *RBCS1*. Isto foi observado para as plantas cultivadas na casa de vegetação ou no campo sob um estresse severo ou moderado.

Palavras-Chave: *Coffea arabica*, estresse hídrico, expressão gênica, *RBCS*.

***RBCS1* EXPRESSION IN COFFEE: *COFFEA* ORTHOLOGS, *COFFEA ARABICA* HOMEOLOGS, AND EXPRESSION VARIABILITY BETWEEN GENOTYPES AND UNDER DROUGHT STRESS**

ABSTRACT: Expression of the *RBCS1* gene was analysed in the allopolyploid context of *C. arabica*. Our study revealed the existence of two homeologous *RBCS1* genes in *C. arabica*: one carried by the *C. canephora* sub-genome (called *CaCc*) and the other carried by the *C. eugenioides* sub-genome (called *CaCe*). Using specific primer pairs for each homeolog, expression studies revealed that *CaCe* was expressed in *C. eugenioides* and *C. arabica* but was undetectable in *C. canephora*. On the other hand, *CaCc* was expressed in *C. canephora* but almost completely silenced in non-introgressed (“pure”) genotypes of *C. arabica*. However, enhanced *CaCc* expression was observed in most *C. arabica* cultivars with introgressed *C. canephora* genome. For both species, water stress led to an important decrease in the abundance of *RBCS1* transcripts. This was observed for plants grown in either greenhouse or field conditions under severe or moderate drought.

Key words: *Coffea arabica*, gene expression, *RBCS*, water stress

INTRODUÇÃO

Os primeiros efeitos do estresse hídrico nos processos fisiológicos e bioquímicos nas plantas foram discutidos extensivamente (Chaves, 1991). O fechamento dos estômatos é uma das respostas à secagem do solo, conseqüentemente limitando a perda de água e a assimilação do carbono (A) pela fotossíntese. Nas plantas de tipo C3, a enzima fotossintética chave é a Rubisco (ribulose-1,5-bis fosfato carboxilase/oxigenase, EC 4.1.1.39), que é responsável para a fixação do CO₂ e da fotorespiração (Jensen & Bahr, 1977). Estudos mostraram que os transcritos *RBCS*

acumulam-se diferencialmente em resposta a vários estresses, levantando a possibilidade de que as subunidades RBCS podem regular a estrutura ou a função da Rubisco (Spreitzer, 2003). Ao nível molecular, o estresse hídrico suprime a expressão de muitos genes fotossintéticos que incluem os genes *RBCS* (Bartholomew *et al.*, 1991; Rizhsky *et al.*, 2002). Durante esse estudo, os genes homeólogos *RBCS1* presentes nos sub-genomas *C. canephora* e *C. eugenioides* da espécie anfidiplóide *C. arabica* foram identificados e a expressão deles foi avaliada em diferentes genótipos de *C. arabica* com e sem a introgressão recente de *C. canephora*. Os efeitos do estresse hídrico (moderado e severo) na expressão de gene *RBCS1* também foram analisados.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal:

As plantas dos genótipos Tupi, Bourbon, Typica, Catuaí, HT832/1, HT832/2 e IPR (97 to 107 [Sera *et al.*, 2010]) de *C. arabica*, de *C. eugenioides* e de *C. canephora* (clone L21) foram cultivadas sem estresse hídrico na coleção do IAPAR (Instituto Agrônomo do Paraná, Londrina). Os clones tolerantes (14, 73 e 120) e sensível (22) à seca da variedade Conilon 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 (de oito anos), cultivados em condições de campo (Embrapa Cerrados, Planaltina-DF) com (I) ou sem (NI) irrigação no sistema de pivô central. Em todos os casos, o potencial de base (Ψ_{pd} : “pre-dawn water potential”) foi medido usando uma bomba de Scholander. Para todas as plantas, as folhas foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e conservadas na temperatura de -80°C até a extração dos RNA totais.

Identificação do gene *CcRBCS1*:

O DNA genômico foi extraído das folhas do clone 14 de *C. canephora* (Geromel *et al.*, 2006) e o gene *CcRBCS1* foi amplificado por PCR usando os *primers* 18244-F (5' GAGAATGGCATCCTCAATGATCTC 3') e 18244-R (5' CAGCCCCAGTTCTCAATTTTATTG 3'). Para a reação de PCR (PTC-100 Thermociclador, MJ Research), foram utilizados 10ng de DNA genômico usando a Taq-platinum DNA polimerase (Invitrogen) com os seguintes parâmetros: uma desnaturação inicial (94°C -2 min.) seguida de 40 ciclos (94°C -30 seg., 55°C -30 seg., 72°C -3 min.), e de uma etapa final da extensão (72°C -7 min.). Os fragmentos de PCR foram purificados (Wizard[®] SV Gel e PCR Clean-Up System, Promega) e seqüenciados com os *primers* utilizados durante a reação de PCR de acordo com o fornecedor (BigDye Terminator Sequencing Kit v3.1 ABI 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems). A seqüência do gene *CcRBCS1* (*CaCc*) foi depositada no banco de dados GenBank com o número de acesso FR772689.

Northern-blot:

RNA total foi extraído e testado pela técnica de Northern blot como descrito anteriormente (Geromel *et al.*, 2006) usando como sonda, o cDNA *CaRBCS1* (GenBank AJ419826, Marraccini *et al.*, 2003), marcado aleatoriamente (“random-priming”) com $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP.

PCR quantitativo em tempo real (qPCR):

As amostras de RNA e as reações de qPCR foram realizadas como descrito previamente (Marraccini *et al.*, 2009). Os pares de *primers* usados foram C18244-F (5' CCGTCTCTTCCCCTCAAAT 3') e C18244-R (5' CCTGAAAGTACAGCCCCAGTTC 3') para o homeólogo *RBCS1-Cc* (*CaCc*), e E18244-F (5' TTGGCCCCGGCCCCCTCAAATT 3') e E18244-R (5' CAGCTAAAAGTACAGCCCCAGTTC 3') para o homeólogo *RBCS1-Ce* (*CaCe*). 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 2.1 (Applied Biosystems). Os níveis da expressão gênica foram apresentados na forma de quantificação relativa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gene *RBCS1* de *C. canephora* (chamado *RBCS1-Cc* ou *CaCc*) foi clonado e seqüenciado (Figura 1). A sua seqüência apresenta 90% de identidade nucléica com o gene *CaRBCS1* de *C. arabica* que corresponde ao gene *RBCS1-Ce* (ou *CaCe*) oriundo do sub-genoma de *C. eugenioides*. Os dois genes mostram uma estrutura similar com três éxons e dois íntrons. Os tamanhos do primeiro e segundos íntron são de 120 pb e 235 pb para *CaCe* e de 130 pb e 238 pb para *CaCc*, demonstrando a existência de polimorfismos interespecíficos para esse gene. Essas seqüências apresentam também polimorfismos nucléicos do tipo inserção/deleção (*indel*) na região 3' transcrita não-traduzida o que permitiu desenhar pares de *primers* específicos (C18244 e E18244) para cada formas alélicas. Esses pares de *primers* foram utilizados em ensaios de PCR quantitativa para analisar a expressão dos genes *RBCS1* nas folhas de plantas de diferentes espécies e genótipos de café.

Usando o pare C18244, uma elevada expressão do gene homeólogo *CaCc* foi observada nas folhas das plantas de *C. canephora* (Tabela 1). Por outro lado, a expressão do mesmo gene foi baixa nas folhas das plantas de *C. arabica*,

como em aquelas dos genótipos que não receberam a introgressão recente de DNA genômico de *C. canephora*, tal como Typica, Bourbon, Caturra, Catuai e Rubi, por exemplo. A situação oposta foi observada com o pare E18244 específico do gene homeólogo *RBCS1-Ce* (*CaCe*). Esses resultados mostraram que a expressão de *CaCe* pode ser considerada como nula em *C. canephora* ($CaCc/CaCe > 1$) enquanto que a expressão de *CaCc* não foi detectada em *C. eugenioides* ($CaCc/CaCe < 1$).

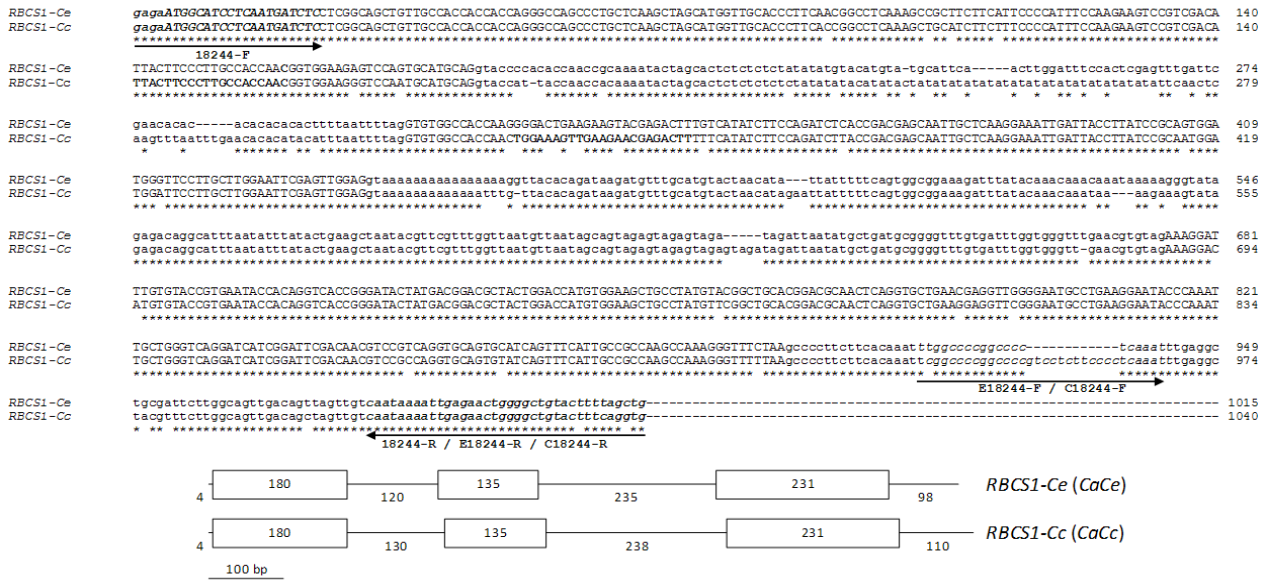


Figura 1 - Alinhamento dos genes *RBCS1* de *C. arabica* e de *C. canephora*. O gene *CaRBCS1* [GenBank: AJ419827], previamente clonado (Marraccini *et al.*, 2003), corresponde ao homeólogo de *C. eugenioides* (*CaCe*: *RBCS1-Ce*), enquanto que o gene *CcRBCS1* (GenBank: FR772689, deste trabalho) corresponde ao homeólogo de *C. canephora* (*CaCc*: *RBCS1-Cc*). As setas horizontais assim como nucleotídeos realçados e em itálicos correspondem às seqüências dos primers. O pare 18244 foi usado para amplificar o gene *CcRBCS1*. Os pares E18244 e C18244 foram usadas as análises de expressão com qPCR para medir a expressão dos genes *CaCe* e *CaCc*, respectivamente. Na parte inferior da figura está a representação esquemática dos genes *CaCe* e de *CaCc* de *RBCS1*. Os éxons estão encaixotados e os números indicam os tamanhos dos fragmentos (em pares de bases [pb]).

Genótipo	Cultivar	Origem	<i>CaCc/CaCe</i>
<i>C. canephora</i>			
	L21		65.93
	14 [†]	Conilon	1324.28
	22 [§]	Conilon	247,10
	73 [†]	Conilon	260.65
	120 [†]	Conilon	236.71
<i>C. arabica</i> ("puro")			
	Rubi [§]	Mundo Novo x Catuai	0.00013
	Bourbon		0.00014
	Typica		0.00017
	Catuai	Mundo Novo x Caturra	0.00021
<i>C. arabica</i> ("introgrado")			
	HT832/1	Híbrido de Timor	0.00004
	HT832/2	Timor hybrid	0.40102
	Icatú	<i>C. canephora</i> x Bourbon	9.33
	IAPAR59 [†]	Villa Sarchi x HT832/2 (Sarchimor)	3.22
	Tupi	Villa Sarchi x HT832/2 (Sarchimor)	2.63
	Obabá	[Villa Sarchi x HT832/2] x Catuai	1.26
	IPR97	Sarchimor	4.98
	IPR98	Sarchimor	21.65
	IPR102	Icatú x Catuai	0.00427
	IPR106	Icatú x Catuai	0.03212
	IPR107	Sarchimor x Mundo Novo	0.12255
<i>C. eugenioides</i>			0.00035

Tabela 1 - Expressão dos genes homeólogos de *RBCS1* nas folhas de diferentes genótipos do café. A expressão foi medida pela relação *CaCc/CaCe* onde os valores de expressão relativa de *CaCc* (*RBCS1-Cc*) e de *CaCe* (*RBCS1-Ce*) foram obtidos usando os pares C18244 e E18244, respectivamente. As quantificações relativas foram normalizadas usando a expressão do gene de referência UBI (no caso do *C. canephora*) ou GAPDH (para as outras espécies). A razão *CaCc/CaCe* corresponde a $(1+E)^{-\Delta Ct}$, onde $\Delta Ct = Ct_{\text{medio}}CaCc - Ct_{\text{medio}}CaCe$ (E : eficiência da amplificação do gene). Quando conhecida, a resposta à seca foi indicada (T = tolerante e S = suscetível). Todos os Sarchimors são derivados do HT832/2.

Os resultados mostraram também uma grande variabilidade da expressão de *CaCc* nas folhas dos dois híbridos de Timor (HT) estudados. Assim, os genes homeólogos *CaCc* e *CaCe* foram expressados com níveis similares ($CaCc/CaCe = 0.4$) no genótipo HT832/2, enquanto *CaCc* não se expressou ($CaCc/CaCe = 4.10^{-5}$) no HT832/1. Nos genótipos introgrididos de *C. arabica* e oriundos dos programas de melhoramento que usaram o HT832/2 ou dos cruzamentos com *C. canephora*, foi observada uma grande variabilidade de expressão dos homeólogos. Por exemplo, uma expressão elevada de *CaCc* foi detectada nas folhas dos genótipos Obatã, Tupi, IAPAR59 (I59), IPR97 e IPR98 assim como em folhas do Icatú. Entretanto, a expressão de gene *CaCc* foi baixa nas folhas do genótipo IPR107 (oriundo do HT832/2) e dos genótipos IPR102 e IPR106 (oriundos do Icatú).

A expressão do gene *RBCS1* foi estudada nas folhas de *C. canephora* submetidas ao estresse hídrico. Para o experimento de Northern blot, um fragmento interno de cDNA *RBCS1* foi usado como a sonda específica (Figura 2A). Para todos os clones, os transcritos *RBCS* de tamanho previsto (aproximadamente 0.9 kb) foram altamente detectados nas plantas irrigadas e mostraram uma queda importante em condição de estresse hídrico. Como controle interno, a expressão do gene de referência *CcUBQ10* (codificando para a ubiquitina: SGN-U637098, Mueller *et al.*, 2005; GW488515, Mondego *et al.*, 2011) apareceu igual em todas as amostras. Para os mesmos clones, a expressão dos genes homeólogos *RBCS1* foi também avaliada pela técnica de PCR quantitativo (qPCR) usando a expressão do gene *CcUBQ10* como uma referência interna (Figura 2B). Para todos os clones, a expressão do gene homeólogo *CaCe* não foi detectada e a quantificação relativa de *CaCc* (RQ_{Cc}) foi escolhida para refletir a expressão total de *RBCS1* (Figura 2C). Esses resultados confirmaram a redução da expressão do gene *CaCc* com o estresse hídrico. Algumas diferenças na expressão do gene *RBCS1* foram observadas entre os clones mas elas não foram correlacionadas com a sensibilidade fenotípica à seca.

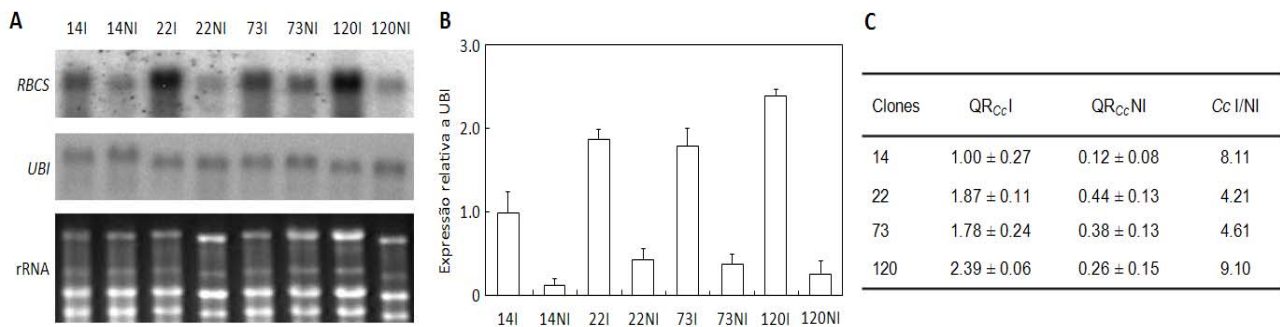


Figura 2 - Perfis de expressão do gene *RBCS1* em *C. canephora*. Para o Northern blot (A), RNA totais (15µg) foram extraídos das folhas dos clones 14, 22, 73 e 120 de Conilon crescidas com (I) ou sem (NI) irrigação, separados por eletroforese no gel de agarose e hibridizados independentemente com sondas de cDNA dos genes *CcRBCS1* (*RBCS*) e *CcUBQ10* (*UBI*). Os RNAs totais coloridos com brometo de etídio foram usados para conferir o depósito igual das amostras. (B) A análise do qPCR foi realizada usando o pare C18244 específico do gene homeólogo *CaCc*. Os níveis da expressão são indicados em quantificação relativa dos transcritos usando a expressão do gene *CcUBQ10* como referência. Os resultados são expressos usando o 14I como calibrador interno. Os valores são a média ± DP (desvio padrão) de três repetições técnicas. (C) Os valores da quantificação relativa (QR) do gene *CaCc* (*Cc*) amplificado são dados para os clones 14, 22, 73 e 120 com (I: $\Psi_{pd} \approx -0.02$ MPa) ou sem (NI: $\Psi_{pd} \approx -3.0$ MPa) irrigação. Os resultados foram normalizados usando a expressão do gene de referência *CcUBQ10* e a razão *Cc I/NI* é indicada.

A expressão do gene *RBCS1* foi também estudada nas folhas dos cultivares Rubi e IAPAR59 de *C. arabica* submetidas ao estresse hídrico. As plantas foram cultivadas no campo sob a irrigação contínua (I) ou sujeitas a 90 dias de estresse hídrico (NI) durante a estação seca de 2008. Os pontos da análise foram antes (N1, não estressado), durante (EH, estresse hídrico) e após (N2, não estressado) da estação seca. Os valores de Ψ_{pd} medidos para o tratamento não-irrigado (NI) durante o período de estresse hídrico foram menos negativos para I59 do que para Rubi (Figura 3A). Por outro lado, os valores de Ψ_{pd} variaram de -0.14 até -0.41 MPa para o tratamento irrigado (I), demonstrando a ausência de estresse hídrico. Para o cultivar I59, a expressão do gene homeólogo *CaCc* (RQ_{Cc}) diminuiu durante a transição de N1 até ES (Figura 3B). Para o cultivar Rubi e para todos os pontos da análise, a expressão do gene *CaCe* (RQ_{Cc}) ficou relativamente estável nas folhas das plantas irrigadas. Entretanto, a expressão total de *RBCS1* ($RQ_{RBCS1-T}$ que corresponde a RQ_{Cc}) diminuiu com o estresse hídrico durante o tratamento NI. Entre os dois cultivares, a comparação dos níveis da expressão total de *RBCS1* revelou uma expressão mais elevada (de 2 até 5x) no I59 que no Rubi, com uma expressão predominante do gene homeólogo *CaCc* sobre o homeólogo *CaCe* no I59. Para ambos os cultivares, os valores totais da expressão de *RBCS1* foram similares antes (N1) e após (N2) o período de estresse hídrico, demonstrando a recuperação da expressão com o retorno da irrigação.

CONCLUSÕES

Nesse estudo, foi possível identificar a existência dos genes homeólogos de *RBCS1* em *C. arabica*. A análise da seqüência do gene de *C. canephora* (chamado *CaCe*) mostrou que esse gene difere do gene *CaRBCS1* previamente descrito em *C. arabica* (e chamado *CaCe* neste estudo). As análises da expressão revelaram que o gene de *CaCe* se expressa em *C. eugenioides* mas também nos genótipos não-introgredidos recentemente de *C. arabica*. Nesses últimos genótipos, a expressão do gene *CaCe* apareceu reprimida provavelmente durante o processo de formação da espécie aloploplóide *C. arabica*. Entretanto, o gene *CaCe* se expressa altamente em alguns cultivares de *C. arabica* tais como aqueles que receberam a introgressão recente de genoma do *C. canephora*. Em condições de estresse hídrico, a expressão dos genes *CaCe* e *CaCc* foram drasticamente reduzidas nas folhas de *C. canephora* e *C. arabica*. Em *C. arabica*, os níveis de expressão do *RBCS1* apareceram maiores nos genótipos introgredidos com genoma do *C. canephora* que nos genótipos de *C. arabica* “puros”, o que poderia ser relacionado com a maior tolerância à seca dos primeiros.

A

Cultivar	Ano	Irrigado (I)			Não-Irrigado (NI)		
		N1	EH	N2	N1	EH	N2
I59	2008	-0.41 ± 0.03	-0.37 ± 0.05	-0.14 ± 0.03	-0.66 ± 0.03	-1.35 ± 0.09	-0.15 ± 0.03
Rubi	2008	-0.28 ± 0.05	-0.20 ± 0.04	-0.17 ± 0.04	-0.45 ± 0.04	-1.96 ± 0.13	-0.18 ± 0.03

B

	Tratamento	Ano	QR _{Cc}	QR _{Ce}	QR _{RBCS1-T}	Cc/Ce
I59	I	N1-08	21.65	6.22	27.87	3.48
		EH-08	6.95	8.99	15.94	0.77
		N2-08	35.17	6.21	41.38	5.66
	NI	N1-08	20.56	5.46	26.03	3.76
		EH-08	11.74	1.60	13.34	7.33
		N2-08	24.19	9.35	33.54	2.59
Rubi	I	N1-08	-	11.58	11.58	-
		EH-08	-	10.38	10.38	-
		N2-08	-	8.00	8.00	-
	NI	N1-08	-	15.99	15.99	-
		EH-08	-	9.52	9.52	-
		N2-08	-	12.46	12.46	-

Figura 3 - Efeito do estresse hídrico na expressão do gene *RBCS1* em *C. arabica*. (A): os potenciais de base (Ψ_{pd}) foram medidos nas folhas das plantas dos cultivares IAPAR59 (I59) e Rubi cultivadas no campo com (I) ou sem (NI: irrigação suspensa para 90 dias) irrigação. Os valores do Ψ_{pd} estão expressos em mega-Pascal (MPa) e os desvios padrão (n = 9 folhas) são indicados. Os potenciais foram medido somente durante a estação seca (EH). Os pontos N1, EH e N2 do ano 2008 correspondem às medidas antes, durante e depois respectivamente ao retorno da irrigação. (B): As folhas dos cultivares I59 e Rubi foram colhidas entre às 10:00 e 12:00h. Os resultados da quantificação relativa (QR) correspondem aos genes *CaCe* (*Ce*) e *CaCc* (*Cc*) amplificados com os pares E18244 e C18244, respectivamente. A expressão total *RBCS1* ($RQ_{RBCS1-T}$) corresponde a soma dos valores $QR_{Cc} + QR_{Ce}$, enquanto que *Cc/Ce* corresponde a razão RQ_{Cc}/RQ_{Ce} . Para o cultivar Rubi, a expressão do gene *CaCc* não foi detectada (-). Os resultados foram normalizados usando a expressão do gene de referência *GAPDH*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARTHOLOMEW, D.M.; BARTLEY, G.E.; SCOLNIK, P.A. Abscisic acid control of *rbcS* and *cab* transcription in tomato leaves. *Plant Physiol* 96(1):291-296, 1991.
- CHAVES, M.M. Effects of water deficits on carbon assimilation. *J Exp Bot* 42(1):1-16, 1991.
- 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. In: I Simpósio de Pesquisa dos Cafês do Brasil, Poços de Caldas-MG, CD-rom: 402-404, 2000.
- GEROMEL, C.; FERREIRA, L.P.; CAVALARI, A.A.; PEREIRA, L.F.P.; GUERREIRO, S.M.C.; POT, D.; LEROY, T.; VIEIRA, L.G.E.; MAZZAFERA, P.; MARRACCINI, P. Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. *J Exp Bot* 57(12): 3243-3258, 2006.
- JENSEN, R.G.; BAHR, J.T. Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. *Ann Rev Plant Physiol* 28:379-400, 1977.
- MARRACCINI, P.; COURJAULT, C.; CAILLET, V.; LAUSANNE, F.; LEPAGE, B.; ROGERS, W.J.; DESHAYES, A. Rubisco small subunit of *Coffea arabica*: cDNA sequence, gene cloning and promoter analysis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol Biochem* 41(1):17-25, 2003.

- 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 a diferentes condições de estresse hídrico. In: VI Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, junho 2009, Vitória, ES, Anais n°422, 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 11: 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 Physiol 138: 1310-1317, 2005.
- RIZHSKY, L.; LIANG, H.; MITTLER, R. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. Plant Physiol 130(3):1143-1151, 2002.
- SERA, G.H.; SERA, T.; DE BATISTA FONSECA, I.C.; ITO, D.S. Resistance to leaf rust in coffee cultivars. Coffee Science 5(1):59-66, 2010.
- SPREITZER, R.J. Role of the small subunit in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. Arch Biochem Biophys 414(2):141-149, 2003.

Agradecimentos: Este projeto foi apoiado pelo CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement, Montpellier, France) por meio do projeto ATP “Análise da plasticidade fenotípica das plantas perenes em condições de estresse hídrico no campo” e pela Embrapa. Bruno Rapidel (Cirad UMR System) forneceu uma calibração específica de sondas Granier para o café. Os autores gostariam de agradecer o Dr. Tumoru Sera (IAPAR), os Drs. Maria Amélia Gava Ferrão, Aymbiré Francisco Almeida da Fonseca e Romário Gava Ferrão (INCAPER) para fornecer plantas e os Drs. Antonio Fernando Guerra e Omar Cruz Rocha (Embrapa) para a ajuda e o auxílio durante as experimentações realizadas no campo da Embrapa Cerrados.