

RNA-SEQ EM *Coffea arabica*: GENES CANDIDATOS EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE ABIÓTICO¹

Luana Ferreira Torres²; Eveline Déchamp³; Gabriel Sérgio Costa Alves⁴; Pierre Marraccini⁵; Hervé Etienne⁶; Alan Carvalho Andrade⁷

¹ Trabalho financiado pelo Programa CAPES-COFECUB (738/12) e INCT-Café (CNPq/FAPEMIG).

² Bolsista Pós-Doutorado, INCT Café – INOVACAFÉ, Campus UFLA/ Lavras – MG, luanaferratorres@yahoo.com.br

³ Pesquisadora, PhD, CIRAD, UMR IPME, Montpellier, FR, eveline.dechamp@ird.fr

⁴ Bolsista Pós-Doutorado, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília - DF, gscalves@gmail.com

⁵ Pesquisador, PhD-HDR, CIRAD, UMR IPME, Institute of Agricultural Genetics (AGI) LMI RICE2, Hanoi, Vietnã, marraccini@cirad.fr

⁶ Pesquisador, PhD, CIRAD, UMR IPME, Montpellier, FR, herve.etienne@cirad.fr

⁷ Pesquisador, PhD, Embrapa Café – INOVACAFÉ, Campus UFLA/ Lavras – MG, alan.andrade@embrapa.br

RESUMO: O objetivo deste estudo foi obter uma visão geral dos genes ativos em folhas de café arábica variedade Caturra quando submetido a vários estresses abióticos e analisar estes genes identificados *in silico* por meio da técnica de RT-qPCR. O material vegetal consistiu de plantas *in vitro* de café arábica expostos por 3 horas sob os diferentes estresses: seca - baixa umidade relativa 9%, frio 5°C, calor 40°C, alta intensidade luminosa 200 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e aplicação exógena de ácido abscísico 10 μM . Após o período de estresse, as folhas de café foram coletadas para a extração de RNA. A preparação da biblioteca de mRNA foi feita através do kit de preparação de amostras de mRNA TruSeq Stranded da Illumina. O sequenciamento foi realizado na plataforma HiSeq 2500 (Illumina) através da técnica SBS (Sequenciamento por Síntese) pela empresa MGX - Montpellier Genomix. A análise de expressão diferencial foi realizada a partir das contagens dos reads brutos usando o pacote estatístico DESeq2. O resultado *in silico* apresentou um total de 17.399 genes diferencialmente expressos entre todos os estresses testados, sendo 2.217, 812, 4.263, 8.008 e 2.099 para o estresse de ABA exógeno, frio, seca, calor e estresse oxidativo, respectivamente. Utilizando esses dados, foram selecionados os genes candidatos mais expressivos nas condições de estresse, os quais foram testados e seus perfis de expressão diferencial foram confirmados pela técnica de RT-qPCR. Através do estudo *in silico* deste trabalho foi possível identificar vários genes candidatos respondendo aos diferentes estresses aplicados, o que pode ajudar na compreensão do determinismo genético de tolerância aos estresses abióticos no cafeeiro. A identificação e caracterização desses genes possibilitam a realização de novos estudos da análise da expressão diferencial entre plantas cultivadas no campo e na estufa. Além disso, a prospecção da variabilidade natural utilizando diferentes materiais genéticos pode permitir a identificação e validação de polimorfismos e alelos ligados aos genes, os quais podem ser utilizados para o desenvolvimento de marcadores moleculares associados à tolerância a vários estresses abióticos.

PALAVRAS-CHAVE: *Coffea*, RT-qPCR, análise de expressão diferencial e estresses abióticos.

RNA-SEQ IN *Coffea arabica*: CANDIDATE GENES IN ABIOTIC STRESS CONDITIONS

ABSTRACT: The objective of this study was to obtain an overview of the active genes in Caturra variety arabica coffee leaves when subjected to various abiotic stresses and to analyze these genes identified *in silico* using the RT-qPCR technique. The plant material consisted of *in vitro* arabica coffee plants exposed for 3 hours under different stresses: drought - low relative humidity 9%, cold 5 °C, heat 40 °C, high light intensity 200 $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and exogenous application of 10 μM abscisic acid. After the stress period, the coffee leaves were collected for RNA extraction. Preparation of the mRNA library was done through Illumina's TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit. The sequencing was performed on the HiSeq 2500 platform (Illumina) using the SBS (Synthesis by Sequencing) technique by MGX - Montpellier Genomix. Differential expression analysis was performed from the raw reads counts using the DESeq2 statistical package. The *in silico* result presented a total of 17,399 differentially expressed genes among all the stresses tested, being 2,217, 812, 4,263, 8,008 and 2,099 for the exogenous ABA stress, cold, drought, heat and oxidative stress, respectively. Using these data, the most expressive candidate genes were selected under the stress conditions tested and their differential expression profiles were confirmed by RT-qPCR experiments. Through *in silico* experiments of this study it was possible to identify several candidate genes responding to the different stresses applied to coffee plants, which may help in understanding the genetic determinism of tolerance to abiotic stresses in coffee trees. The identification and characterization of these genes make it possible to carry out new studies of differential expression analysis between field and greenhouse plants, and the prospecting of natural variability using different genetic materials, which allow the identification and validation of specific polymorphisms and alleles for the development of molecular markers associated with tolerance to various abiotic stresses.

KEY WORDS: *Coffea*, RT-qPCR, differential expression analysis, abiotic stresses.

INTRODUÇÃO

Restrições de crescimento do cafeeiro e estresse devido às mudanças ambientais resultam em produtividade reduzida e perdas culturais significativas (Lata & Prasad 2011). A variabilidade climática sempre foi o principal fator responsável pela flutuação dos rendimentos do café em todo o mundo. A mudança climática, como resultado do aquecimento global, deverá representar um grande desafio para a indústria do café (Van Hilten 2011). Nos últimos anos, *Coffea* ssp. tornou-se o assunto de interesse crescente nas pesquisas de análise da expressão gênica, no entanto, poucos trabalhos se concentraram na seleção de genes de referência confiáveis para a normalização de dados, em estudos envolvendo cafeeiros sob diferentes condições de estresse abiótico (Nobile et al. 2010; dos Santos et al. 2015; Ivamoto et al., 2017). A análise da expressão gênica tem sido amplamente utilizada como um método para estudar a complexa sinalização e as vias metabólicas subjacentes aos processos celulares e de desenvolvimento em organismos biológicos, incluindo plantas. Um número crescente de estudos de níveis de expressão de vários genes em plantas foi realizado para entender os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento e crescimento de plantas, bem como em respostas a estresses bióticos (infecção por patógenos) e abióticos (ambientais) (Dechorgnat et al. 2012). Para identificar genes candidatos envolvidos em vários estresses abióticos em cafeeiros, folhas de *C. arabica* variedade Caturra sob diferentes condições de estresse, tais como temperatura, alta intensidade luminosa, aplicação de ABA exógeno e estresse hídrico, foram usadas para gerar bibliotecas, as quais foram sequenciadas usando a técnica Illumina. Um transcriptoma completo de referência foi anotado e comparado para identificar os perfis de transcrição de genes diferencialmente expressos sob várias condições de estresse abiótico. Além disso, a expressão desses genes foi analisada por RT-qPCR nas folhas dessas plantas. O objetivo deste estudo foi obter uma visão global dos transcritos ativos em *C. arabica* usando a técnica de RNA-Seq e analisar genes específicos altamente expressos em folhas com potencial de características exploratórias para melhoramento e compreensão da biologia evolutiva do café.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas jovens previamente descritas por Alves et al. (2017) e cultivadas em câmaras de crescimento (em 2014) no IRD (Institut de Recherche pour le développement, Montpellier, França) foram usadas nos experimentos de estresse abiótico. Todos esses experimentos começaram por volta das 10h (após um período de luz de 2 horas) e foram aplicados por 12 horas, com exceção do tratamento com ABA, que foi aplicado por períodos de 24 e 48 horas. Baixa umidade relativa (LH): a baixa umidade (9%) foi criada utilizando 500 ml de solução de supersaturação de hidróxido de potássio (KOH) vertida no compartimento inferior de um biorreator de imersão temporário (Matis®, CID Plastiques, França) com 10 plantas incubadas no biorreator a 26°C. Frio e calor (LT e HT): as plantas foram transferidas da câmara de crescimento (26°C) para uma câmara fria a 5°C e para uma estufa aquecida a 40 °C, ambas condições sem iluminação. Alta intensidade luminosa (HL): a intensidade da luz da câmara de crescimento foi repentinamente aumentada de 70 para 200 $\mu\text{Mm}^{-2} \text{s}^{-1}$ (sem alteração do espectro). Ácido abscísico exógeno (ABA): as plantas foram transferidas do meio de maturação "M" (Etienne 2005) para frascos Gerber contendo o mesmo meio suplementado com ABA 10 μM (Sigma Aldrich, St Louis, EUA).

EXPRESSÃO GÊNICA *IN SILICO*

A expressão do haplótipo pHP16L do promotor CcDREB1D foi analisada através de uma abordagem transcriptômica sob todos os estresses abióticos descritos acima. Após um período de 3 horas de exposição ao estresse, as folhas foram coletadas, transferidas para nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C até a extração do RNA. O RNA total foi extraído e tratados como descrito em Breitler et al. (2016).

SEQUENCIAMENTO DO RNA

Três amostras foram usadas em triplicata biológica para cada condição de estresse testada. O controle de qualidade das sequências foi realizado pelo software FastQC e a busca por contaminantes no software FastQ Screen (alinhador Bowtie2). O mapeamento foi realizado pelo algoritmo TopHat2 v2.0.13 (com Bowtie 2.2.3). Cufflink e Cuffdiff também foram utilizados, seguindo o protocolo Tuxedo para a análise do RNA-Seq, seguido do pacote cummeRbund do R para a visualização dos resultados. O software HTSeq-count (versão 0.6.1p1) também foi usado para a contagem dos reads alinhados aos genes.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O experimento consistiu de 6 tratamentos (RH 9%, Frio 5°C, Calor 40°C, ABA 10 μM , alta intensidade luminosa 200 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e Controle - sem estresse) com 3 triplicatas para cada um. A análise de expressão diferencial foi realizada a partir das contagens dos reads brutos usando o pacote DESeq2 (Anders & Huber 2010).

RT-QPCR

O cDNA foi sintetizado usando 1 μg de RNA total de acordo com as recomendações do fabricante (Promega, Madison, WI, EUA). Experimentos de RT-qPCR foram realizados utilizando o protocolo recomendado para o uso de um sistema de PCR 7500 Fast Real-Time (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), como previamente descrito por Marraccini

et al. (2012). Primers foram desenhados usando o software Primer Express (Applied Biosystems) e foram testados preliminarmente para sua especificidade e eficiência contra uma mistura de cDNA das folhas. Os dados foram analisados usando o 7500 Fast Software v2.0.6 (Applied Biosystems) e os níveis de expressão gênica foram normalizados para o nível de expressão do gene de referência CaGAPDH (de Carvalho et al. 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um gene foi considerado como diferencialmente expresso quando foi identificado em pelo menos um software considerando $\text{fold-change} \geq 2$ e/ou $\text{p-value} \leq 0.05$. A Tabela 1 mostra os números de genes diferencialmente expressos relatados (valor de $p < 0,05$) em folhas de café arábica para cada comparação e testados estatisticamente pelo DESeq2. Os resultados da análise de Cuffdiff são apresentados na figura 1 e mostram que também foi muito eficiente na detecção de expressão diferencial, entre as condições testadas.

Tabela 1. Número de genes diferencialmente expressos por comparação entre os tratamentos de acordo com a análise estatística testada.

Comparação	ABA x NON STRESS	COLD x NON STRESS	DROUGHT x NON STRESS	HEAT x NON STRESS	LIGHT x NON STRESS	ABA x HEAT	ABA x COLD	ABA x LIGHT	ABA x DROUGHT	HEAT x COLD	HEAT x LIGHT	HEAT x DROUGHT	COLD x LIGHT	COLD x DROUGHT	LIGHT x DROUGHT
Número de genes	2.217	812	4.263	8.008	2.099	8.815	2.932	2.066	6.096	7.556	8.847	8.070	4.726	4.449	6.422

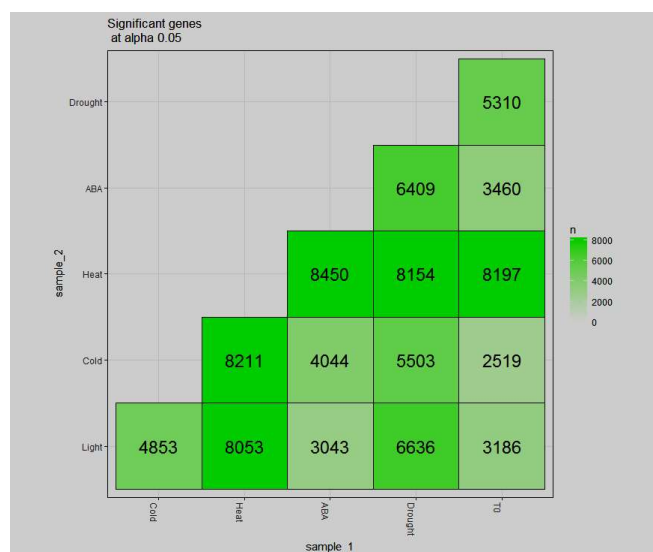


Figura 1. Número de genes diferencialmente expressos detectados pela análise de Cuffdiff entre as condições testadas.

Para cada estresse, de todos os genes diferencialmente expressos identificados por DESeq2, foram escolhidos os com maiores valores de expressão para validação do padrão transcricional em folhas de *C. arabica*, e para verificar se o estresse abiótico aplicado induziu a expressão de genes previamente descritos, conhecidos como ativados em resposta ao correspondente estresse. A anotação funcional de cada gene correspondente no genoma de *C. canephora* é exposta na tabela 2 e mostra que genes responsivos conhecidos estão presentes neste conjunto selecionado.

Tabela 2. Genes candidatos encontrados em plantas de café arábica submetidas a estresse hídrico, altas e baixas temperaturas, alta intensidade luminosa e aplicação exógena de ABA e suas correspondentes identificações e funções no genoma de *Coffea canephora*.

Estresse	Proteína	<i>C. canephora</i>	Nome da proteína
ABA	GSCOCT00042866001	<i>Cc00_g10980</i>	secologanina sintase
	GSCOCT00041755001	<i>Cc11_g15020</i>	Ubiquitina tioesterase Otubain
	GSCOCT00020154001	<i>Cc00_g03670</i>	Citocromo P450
	GSCOCT00039580001	<i>Cc00_g34090</i>	Putative Genome polyprotein
	GSCOCT00039726001	<i>Cc02_g34210</i>	Pre-mRNA-splicing factor SF2
Calor	GSCOCT00027060001	<i>Cc02_g22170</i>	Late embryogenesis abundant (LEA)
	GSCOCT00015069001	<i>Cc10_g00400</i>	protein localized to the inner membrane of the chloroplast
	GSCOCT00034975001	<i>Cc00_g10880</i>	Oligopeptide transporter 2
	GSCOCP00023436001	<i>Cc06_g01960</i>	17.5 kDa classe I heat shock protein
	GSCOCP00027100001	<i>Cc08_g11080</i>	***** No hits found *****
	GSCOCP00030466001	<i>Cc08_g12550</i>	Small heat shock protein, chloroplastic
	GSCOCP00028328001	<i>Cc01_g13580</i>	17.5 kDa class I heat shock protein
Frio	GSCOCT00037003001	<i>Cc00_g33530</i>	(S)-coclaurine-N- Methyl transferase
	GSCOCT00034783001	<i>Cc00_g10160</i>	Putative late blight resistance protein homolog R1B-16
	GSCOCT00041399001	<i>Cc00_g02570</i>	Polyubiquitin 3
	GSCOCP00031828001	<i>Cc03_g14300</i>	***** No hits found *****
	GSCOCP00041399001	<i>Cc06_g13430</i>	Probable xyloglucan endotransglucosylase / hydrolase protein 23
	GSCOCP00022898001	<i>Cc06_g20030</i>	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1
	GSCOCP00034605001	<i>Cc10_g06840</i>	Phosphate-responsive 1 family protein
Luz	GSCOCT00034975001	<i>Cc00_g10880</i>	Oligopeptide transporter 2
	GSCOCT00014441001	<i>Cc00_g19080</i>	Hypothetical protein
	GSCOCT00042866001	<i>Cc00_g10980</i>	Secologanin synthase
	GSCOCT00024120001	<i>Cc11_g14900</i>	40S ribosomal protein S27-1
	GSCOCT00034974001	<i>Cc10_g11560</i>	Putative uncharacterized protein
Seca	GSCOCT00034783001	<i>Cc00_g10160</i>	Putative late blight resistance protein homolog R1B-16
	GSCOCP00032798001	<i>Cc11_g09020</i>	Putative UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyltransferase 3
	GSCOCP00034723001	<i>Cc10_g06020</i>	Putative Predicted protein
	GSCOCP00030281001	<i>Cc08_g13960</i>	Putative Dehydration-responsive element-binding protein 1D
	GSCOCT00037166001	<i>Cc07_g10030</i>	DH1a - desidrina
	GSCOCT00042862001	<i>Cc02_g32610</i>	GolS3 - galactinol sintase

Os resultados apresentados na Figura 2 mostram os genes com maior expressão diferencial *in silico* que obtiveram expressão *in vivo*, nos diferentes estresses testados. Relacionando os gráficos da figura 2 com as informações da tabela 2 podemos verificar que alguns genes foram expressos *in vivo* em situações de estresses diferentes (ou estresses adicionais) para os quais foram expressos *in silico*. São eles: *Cc10_g11560*, *Cc06_g20030*, *Cc11_g15020*, *Cc00_g10980*, *Cc00_g19080*, *Cc11_g14900*, *Cc10_g00400* e *Cc02_g34210*.

Como o objetivo final deste estudo foi identificar potenciais genes candidatos a respostas de estresse abiótico em folhas de café, alguns foram caracterizados a partir das comparações com bancos de dados e selecionados para validação por meio de qPCR. Neste estudo, *Cc07_g10030* apresentou alta expressão nas folhas e foi anotado como uma desidrina (DH1a). As desidrinas (DHNs) desempenham um papel fundamental na resposta e adaptação das plantas aos estresses abióticos e já foram descritas como sendo induzidas pelo estresse hídrico no café (Marraccini et al. 2012). Essas proteínas se acumulam tipicamente em sementes em maturação ou são induzidas em tecidos vegetativos após estresse de salinidade, desidratação, frio e congelamento. Possíveis funções para vegetais desidratados selecionados em inúmeros estudos transgênicos revelaram um efeito positivo da expressão do gene da desidrina na tolerância ao estresse da planta, principalmente seca (e variações) e frio (Hanin et al. 2011). Outro gene com alta expressão nas folhas foi *Cc02_g32610*, e anotado como Galactinol sintase. Células vegetais usam myo-inositol para sintetizar uma variedade de compostos de baixo peso molecular e álcoois de açúcar, como o galactinol, um elemento chave na formação de oligossacarídeos da família da rafinose. Nishizawa et al. (2008) descobriram que plantas com alto teor de galactinol e rafinose eram menos suscetíveis ao estresse oxidativo. Em *C. arabica*, a regulação positiva dos genes *CaGolS* envolvidos na biossíntese do galactinol foi relatada em folhas de plantas submetidas a secas severas (dos Santos et al. 2011; Marraccini et al. 2012). Muitos dos genes de estresse induzidos pela seca identificados em *C. arabica* também foram identificados em *C. canephora* em estudos anteriores (Vinecky et al. 2012; Marraccini et al. 2012; Vieira et al. 2013; dos Santos et al. 2015; Moffato et al. 2016).

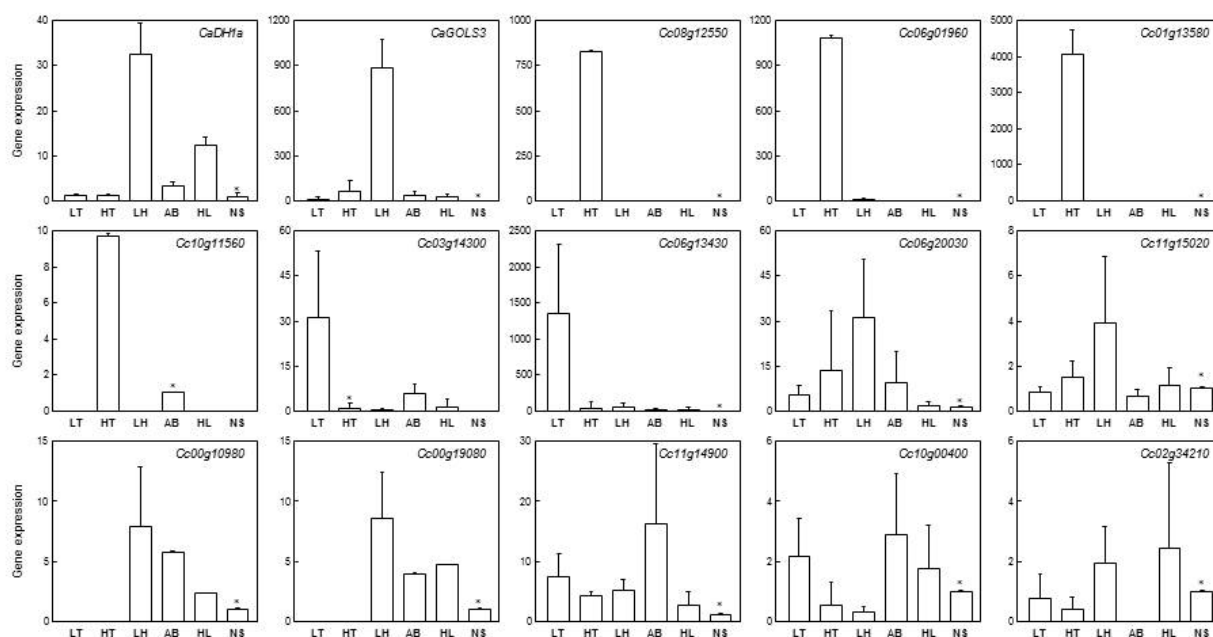


Figura 2. Expressão de genes diferencialmente expressos em folhas de *Coffea arabica* submetidas a baixas (LT) e altas (HT) temperaturas, baixa umidade (LH), tratamento com ABA exógeno (AB) e alta intensidade luminosa (HL). Os nomes dos genes são indicados nos histogramas. Os valores da expressão correspondentes à média das três repetições biológicas e técnicas são expressos em relação ao nível de expressão da amostra NS (sem estresse) utilizada como amostra de referência (expressão relativa = 1). As abundâncias dos transcritos foram normalizadas usando a expressão do gene *CaGAPDH* como controle endógeno.

O gene *Cc11_g15020* foi inicialmente identificado pelas análises *in silico* como responsivo ao estresse de ABA. A expressão *in vivo* é, a priori, induzida com LH, mas aparentemente com os outros estresses também. Esse gene possui uma proteína com domínio peptidase, se caracterizando como uma proteína de regulação da de-ubiquitinação possuindo vários papéis na regulação de proteínas, bem como da expressão gênica (epigenética) por meio de de-ubiquitinação de histona (March & Farrona 2018).

O gene *Cc10g11560* codifica para uma proteína que se encontra em *C. arabica*, *C. canephora* e *C. eugenioides* (folhas) e também em várias plantas, mas possui função desconhecida (“uncharacterized protein”, sem domínios conservados). O gene *Cc06g13430* foi um dos com maiores valores de expressão *in vivo*, e codifica para uma proteína do tipo XTH1 implicada no rearranjo da parede primária. Em plantas superiores, a expressão de genes XTH mostrou ser regulada por fatores abióticos, tais como toque, escuridão, choque frio e choque térmico (Xu et al. 1996), e por vários hormônios, entre eles o ácido abscísico (Wu et al. 1994). Os XTHs codificam enzimas apoplásticas ligadas à modificação da parede celular, regulação da percepção do estresse e transdução de sinal (Pignocchi & Foyer, 2003).

Os genes *Cc08g12550*, *Cc06g01960* e *Cc01g13580* apresentaram os maiores níveis de expressão detectados para altas temperaturas pela expressão *in vivo*. Codificam para proteínas Heat Shock, mas de diferentes classes (Mofatto et al. 2016).

CONCLUSÕES

1. Através das análises *in silico* e *in vivo* apresentadas neste estudo foi possível selecionar diversos genes candidatos que respondem a diferentes estresses abióticos no café;
2. Muitos dos genes de estresse induzidos pela seca identificados em *C. arabica* também foram identificados em *C. canephora* em estudos anteriores, indicando respostas moleculares similares nas duas espécies.
3. A identificação e caracterização desses genes possibilitam a realização de novos estudos, como a análise da expressão diferencial entre plantas cultivadas em campo e em casa de vegetação, ou a prospecção da variabilidade natural utilizando diferentes materiais genéticos, que possibilitam a identificação e validação de polimorfismos e de alelos específicos para o desenvolvimento de marcadores moleculares associados à tolerância a vários estresses abióticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, G. S. C., TORRES, L.F., DECHAMP, E., et al. (2017). Differential fine tune regulation of gene expression in coffee leaves by *CcDREB1D* promoter haplotypes under water deficit. *Journal of Experimental Botany* 68:3017–3031.
- ANDERS, S., HUBER, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology* 11:R106.
- BREITLER, J.-C., CAMPA, C., GEORGET, F., BERTRAND, B., ETIENNE, H. (2016). A single-step method for RNA isolation from tropical crops in the field. *Scientific Reports* 6:38368.
- de CARVALHO, K., BESPALHOK, F.J.C., dos SANTOS, T.B., et al. (2013). Nitrogen starvation, salt and heat stress in coffee (*Coffea arabica* L.): identification and validation of new genes for qPCR normalization. *Molecular Biotechnology* 53:315-25.
- DECHORGNAT, J., PATRIT, O., KRAPP, A., FAGARD, M., DANIEL-VEDELE, F. (2012). Characterization of the Nrt2.6 gene in *Arabidopsis thaliana*: A link with plant response to biotic and abiotic stress. *PLoS One* 7 7:e42491.
- ETIENNE, H. (2005). Somatic embryogenesis protocol: Coffee (*Coffea arabica* L. and *C. canephora* P.). In: SM Jain, PK GUPTA, eds, *Protoc. Somat. Embryog. Woody Plants*. Springer, Netherlands, pp 167–179.
- HANIN, M., BRINI, F., EBEL, C., TODA, Y., TAKEDA, S., MASMOUDI, K. (2011). Plant dehydrins and stress tolerance - Versatile proteins for complex mechanisms. *Plant Signaling & Behavior*. 6:1503-1509.
- IVAMOTO, S.T, REIS, O. Júnior., DOMINGUES, D.S., dos SANTOS, T.B., de OLIVEIRA, F.F., POT, D., et al. (2017). Transcriptome Analysis of Leaves, Flowers and Fruits Perisperm of *Coffea arabica* L. Reveals the Differential Expression of Genes Involved in Raffinose Biosynthesis. *PLoS ONE* 12(1): e0169595.
- LATA, C., PRASAD, M. (2011). Role of *DREBs* in regulation of abiotic stress responses in Plants. *Journal of Experimental Botany* 62:4731–4748.
- MARCH, E., FARRONA, S. (2018). Plant Deubiquitinases and Their Role in the Control of Gene Expression Through Modification of Histones. *Frontiers Plant Science* 8:2274.
- MARRACCINI, P., VINECKY, F., ALVES, G.S.C., RAMOS, H.J.O., ELBELT, S., VIEIRA, N.G. et al. (2012). Differentially expressed genes and proteins upon drought acclimation in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. *Journal of Experimental Botany* 63:4191–212.
- MOFATTO, L.S., CARNEIRO, F.A., VIEIRA, N.G. (2016). Identification of candidate genes for drought tolerance in coffee by high-throughput sequencing in the shoot apex of different *Coffea arabica* cultivars. *BMC Plant Biology* 16:94.
- NISHIZAWA, A., YABUTA, Y., SHIGEOKA, S. (2008). Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology* 147:1251–63.
- NOBILE, P.M., QUECINI, V., BAZZO, B. et al., (2010). Transcriptional profile of genes involved in the biosynthesis of phytate and ferritin in *Coffea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:3479–3487.
- PIGNOCCHI, C., FOYER, C. H. (2003). Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 379–389.
- dos SANTOS, T.B., BUDZINSKI, I.G.F., MARUR, C.J., PETKOWICZ, C.L.O., PEREIRA, L.F.P., VIEIRA, L.G.E. (2011). Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea arabica* L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses. *Plant Physiology Biochemistry*. 49:441–8.
- dos Santos, T. B., LIMA, R. B., Nagashima, G. T., Petkowicz, C. L. O., et al. (2015). Galactinol synthase transcriptional profile in two genotypes of *Coffea canephora* with contrasting tolerance to drought. *Genetics and Molecular Biology* 38:182-190.
- VAN HILTEN, H.J. (2011). *The coffee exporter's guide*. Geneva
- VIEIRA, N.G., CARNEIRO, F.A., SUJII, P.S., ALEKCEVETCH, J.C., FREIRE, L.P., VINECKY, F. et al., (2013). Different molecular mechanisms account for drought tolerance in *Coffea canephora* var. Conilon. *Tropical Plant Biology* 6:181–90.
- VINECKY, F., da SILVA, F.R., ANDRADE, A.C. (2012). Análise *in silico* das bibliotecas de cDNA SH2 e SH3 para a identificação de genes responsivos à seca em cafeeiro. *Coffee Science* 7:1–19.
- XU, W., CAMPBELL, P., VARGHEESE, A.K., BRAAM, J., (1996). The *Arabidopsis* XET-related gene family: environmental and hormonal regulation of expression. *The Plant Journal* 9, 879–889.
- WU, Y., SPOLLEN, W.G., SHARP, R.E., HETHERINGTON, P.R., FRY, S.C. (1994). Root growth maintenance at low water potentials: increased activity of xyloglucan endotransglucosylase and its possible regulation by abscisic acid. *Plant Physiology* 106, 607–615.