



THARYN REICHEL

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES DA
SUBFAMÍLIA *DREB* EM RESPOSTA À SECA
EM PLANTAS DE *Coffea canephora* Conilon**

LAVRAS – MG

2016

THARYN REICHEL

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES DA SUBFAMÍLIA *DREB* EM
RESPOSTA À SECA EM PLANTAS DE *Coffea canephora* Conilon**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Pierre Roger René Marraccini

Coorientador

Dr. Alan Carvalho Andrade

LAVRAS – MG

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Reichel, Tharyn .

Análise da expressão dos genes da subfamília *DREB* em
resposta à seca em plantas de *Coffea canephora* Conilon / Tharyn
Reichel. – Lavras : UFLA, 2016.

88 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2016.

Orientador(a): Pierre Roger René Marraccini.

Bibliografia.

1. Fator de transcrição DREB. 2. Expressão gênica. 3.
Tolerância à seca. 4. Cafeeiro. I. Universidade Federal de Lavras.
II. Título.

THARYN REICHEL

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES DA SUBFAMÍLIA *DREB* EM
RESPOSTA À SECA EM PLANTAS DE *Coffea canephora* Conilon**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de março de 2016.

Dr. Alan Carvalho Andrade

Embrapa Café

Dra. Milene Alves de Figueiredo Carvalho

Embrapa Café

Dr. Pierre Roger René Marraccini

Embrapa Cenargen / CIRAD

Dr. Pierre Roger René Marraccini

Orientador

LAVRAS – MG

2016

AGRADECIMENTOS

À Deus, por cada dia que guiou meus passos.

Aos meus pais, irmã e William, pela preocupação constante, inesgotável paciência, apoio diário e alegria que me impulsionava cada dia. Tudo se tornou mais leve graças a vocês!

Aos companheiros de Laboratório: Fernanda, Simone, Wendel, Renan e em especial à Sinara, pela ajuda na condução do trabalho, pelos conhecimentos transmitidos e pela enorme paciência. Vocês tornaram meus dias mais alegres!

À Michelle e Tatiana pelas extrações de RNA de qualidade, à Luana pela entrega dos *primers* e à Ana Paula pela explicação sobre o *software* LinRegPCR.

À Paula, que sempre buscou me tranquilizar e mostrar que no final tudo dá certo!

Às amigas de república, que foram as melhores companheiras para se conviver e que sempre me incentivaram. Só tenho a agradecer vocês pelos momentos em que me aguentaram!

Aos meus amigos de longe, que mesmo assim estão sempre perto. Vocês são sempre especiais!

Ao orientador Dr. Pierre, por tornar possível a realização deste projeto, pelos valiosos ensinamentos, pela preocupação, paciência e confiança. Minhas dúvidas e problemas sempre foram atendidos. Só tenho a lhe agradecer pela oportunidade e pelo exemplo de pessoa e profissional!

Ao coorientador Dr. Alan, pela preocupação constante, pelas sugestões de experimentos, pelos ensinamentos e pela confiança. Obrigada pela ajuda e aprendizado!

Aos membros da banca examinadora, Dr. Alan Carvalho Andrade, Dra. Milene Alves de Figueiredo Carvalho e Dr. Pierre Marraccini por aceitarem o convite da defesa do projeto e pela contribuição na correção do mesmo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, pelas experiências, exemplos e ensinamentos transmitidos. Em especial ao coordenador do curso, Professor Luciano, pela atenção e solicitações sempre atendidas e ao Professor Mario Lúcio, pelo auxílio financeiro. Obrigada!

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

A todos não mencionados que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“Sou muito grato às adversidades que apareceram na minha vida, pois elas me ensinaram a tolerância, a simpatia, o autocontrole, a perseverança e outras qualidades que, sem essas adversidades eu jamais conheceria.”

Napoleon Hill

RESUMO

Coffea canephora é uma das espécies de cafeeiro mais importantes economicamente e no Brasil, Conilon é a planta mais amplamente cultivada dessa espécie. Estresses abióticos como as variações de temperatura e períodos de seca são fatores que afetam significativamente a sua produção e tendem a se agravar com as mudanças climáticas reconhecidas mundialmente. Na tentativa de compreender as respostas moleculares do cafeeiro em condições de déficit hídrico, recentes estudos identificaram genes candidatos (GCs), como *CcDREB1D*. Este gene apresentou maior expressão em resposta à seca nas folhas do clone 14 (tolerante à seca) em relação ao clone 22 (sensível à seca) de *C. canephora* Conilon. Baseado nesses resultados, na identificação dos genes *DREB* e seus subgrupos (SGs) de *C. canephora*, objetiva-se analisar a expressão *in silico* e também *in vivo* desses genes de *C. canephora* nas folhas e raízes de clones tolerantes (14, 73 e 120) e sensível (22) de *C. canephora* Conilon submetidas ou não a um déficit hídrico. As expressões *in silico* de todos os genes *DREB* foram analisadas a partir do Banco de Dados Coffee Genome Hub e a expressão *in vivo* foi realizada pela técnica "reverse transcription-quantitative PCR" (RT-qPCR). Nas análises de expressão gênica *in silico* foi possível identificar genes *DREB* com potenciais respostas aos estresses abióticos, corroborando com alguns resultados validados *in vivo*. Nesta análise, diversos genes mostraram expressão diferencial em resposta à seca entre os SGs (I-IV), os clones tolerantes e sensível e as folhas e raízes. Esses genes com expressão diferencial foram identificados como potenciais GCs e entre eles, verificou-se que a maioria dos clones tolerantes apresentou maior expressão em relação ao sensível em resposta à seca, com os maiores níveis de expressão para os clones 14 e 73. Esses maiores níveis foram observados em folhas quando comparado com as raízes e o SG-I se destacou pelo maior número de genes expressos em resposta à seca. Esses resultados sugerem que os GCs *DREB*, como *Cc05_g06840*, *Cc02_g03420* e *Cc08_g13960*, desempenham um papel importante nos mecanismos regulatórios de resposta à seca em *C. canephora* Conilon.

Palavras-chave: *Coffea canephora*. *DREB*. Fator de transcrição. Expressão gênica. Tolerância à seca.

ABSTRACT

Coffea canephora is one of the most economically important coffee species and in Brazil, Conilon is the most widely cultivated plant of this species. Abiotic stresses such as temperature variations and drought periods are factors that significantly affect their production and tend to worsen with globally recognized climate changes. In an attempt to understand the molecular responses of coffee plants in water deficit conditions, recent studies have identified candidate genes (CGs) as *CcDREB1D*. This gene showed increased expression in response to drought in the leaves of clone 14 (drought tolerant) in relation to the clone 22 (sensitive to drought) of *C. canephora* Conilon. Based on these results, the identification of *DREB* genes and their subgroups (SGs) of *C. canephora*, the objective is to analyze *in silico* and also *in vivo* these genes expression in leaf and root of tolerant (14, 73 and 120) and sensitive clones (22) of *C. canephora* Conilon submitted or not to a water deficit. *In silico* expressions of all *DREB* genes were analyzed from the Coffee Genome Hub Database and *in vivo* expression was performed by the technique "reverse transcription-quantitative PCR" (RT-qPCR). *In silico* gene expression analysis was possible to identify *DREB* genes with potential responses to abiotic stresses, corroborating some validated *in vivo* results. In this analysis, several genes showed differential expression in response to drought among the SGs (I-IV), the tolerant and sensitive clones and the leaf and root. These differentially expressed genes were identified as potential CGs and among them, it was found that most tolerant clones showed increased expression in relation to sensitive in response to drought, with higher expression levels for clones 14 and 73. These highest levels were observed in leaves compared to the roots and SG-I stood at greater number of genes expressed in response to drought. These results suggest that *DREB* CGs, as *Cc05_g06840*, *Cc02_g03420* e *Cc08_g13960*, play an important role in the regulatory mechanisms of response to drought in *C. canephora* Conilon.

Keywords: *Coffea canephora*. *DREB*. Transcription factor. Gene expression. Drought tolerance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Origem geográfica dos principais grupos genéticos de <i>Coffea canephora</i> . Em vermelho, origem geográfica do <i>pool</i> Guineano e em verde, origem geográfica dos grupos genéticos do <i>pool</i> Congolês.....	6
Figura 2	Origem de <i>C. arabica</i> . Os genomas progenitores são representados pelas espécies diploides <i>C. eugenoides</i> e <i>C. canephora</i> . <i>C. arabica</i> surgiu entre 1 e 2 milhões de anos atrás (m.a.a.) a partir da fusão de <i>C. canephora</i> (ou espécies relacionadas) e <i>C. eugenoides</i>	8
Figura 3	Sistemas de raízes de clones tolerantes (14 e 120) e sensíveis (46 e 109A) de <i>C. canephora</i> cultivados com total irrigação.	12
Figura 4	A evolução de Ψ_{pd} (“pre-dawn leaf water potential”) nas folhas de <i>C. canephora</i> . Os clones 14, 22, 73 e 120 de <i>C. canephora</i> Conilon foram cultivados em casa de vegetação sob déficit hídrico. Para cada clone, as evoluções de Ψ_{pd} são apresentadas conforme os dias após suspensão hídrica (Δ , clone 22-NI; \blacktriangle , 14-NI; \blacksquare , 120-NI; \bullet , 73-NI).	13
Figura 5	Genes induzidos durante o déficit hídrico e frio e suas possíveis funções na tolerância e resposta ao estresse.....	16
Figura 6	Representação esquemática das vias de transdução do sinal celular que conduzem a partir da percepção do sinal a expressão do gene. Os genes <i>DREB1/CBF</i> são induzidos pelo estresse causado pelo frio, enquanto que <i>DREB2</i> são induzidos pelos estresses de desidratação e salino. Ambos trabalham em vias independentes de ABA. <i>CBF4</i> , <i>MYC/MYB</i> e <i>bZIP</i> são induzidos pela desidratação/estresse salino e trabalham em uma via dependente de ABA. <i>DREB1/CBF</i> e <i>DREB2</i> se ligam ao elemento <i>cis</i> -atuante DRE/CRT, <i>MYC/MYB</i> e <i>bZIP</i> a ABRE.	19
Figura 7	Expressão do gene <i>CcDREB1D</i> nas folhas dos clones 14, 73 e 120 (tolerantes) e 22 (sensível) de <i>C. canephora</i> submetidos (NI: Não Irrigado) ou não (I: Irrigado) ao déficit hídrico. A expressão desse gene foi analisada por qPCR. O gene <i>CcUBQ10</i> foi utilizado como gene de referência e 14I como amostra de referência.	21
Figura 8	Conjunto da subfamília <i>DREB</i> de <i>C. canephora</i> divididos nos aos subgrupos I, II, III e IV, destacados em azul claro, verde, azul escuro e vermelho, respectivamente. Membros de <i>CcDREB</i> estão em negrito e o quadrado vermelho mostra <i>CcDREB1D</i> . A árvore de <i>DREB</i> abriga sequências homólogas de <i>A. thaliana</i> , <i>C. canephora</i> ,	

	<p><i>S. lycopersicon</i>, <i>S. tuberosum</i>, <i>O. sativa j.</i>, <i>V. vinifera</i> e <i>Z. mays</i> foram enraizadas com a árvore filogenética de viridiplantae. Todos os genes de todos os subgrupos foram testados em ensaios preliminares pela RT-qPCR. ●, genes analisados quanto a sua expressão em resposta à seca em folhas e raízes de <i>C. canephora</i> Conilon pela RT-qPCR. ▲, genes considerados candidatos em resposta à seca após as análises de expressão gênica <i>in vivo</i> e posterior seleção dos melhores genes com base nos maiores níveis de expressão na condição de déficit hídrico.....</p>	23
Figura 9	<p>Representação em “<i>heatmap</i>” dos valores de expressão dos genes <i>DREB</i> (RPKM) do SG-I de <i>C. canephora</i> em diferentes tecidos (endosperma, perisperma, folha, pistilo, estame e raiz), obtidos a partir de dados de RNA-Seq de <i>C. canephora</i>. As cores mais próximas do vermelho mais intenso indicam maior expressão dos genes <i>DREB</i> conforme os tecidos analisados.....</p>	31
Figura 10	<p>Representação em “<i>heatmap</i>” dos valores de expressão dos genes <i>DREB</i> (RPKM) do SG-II de <i>C. canephora</i> em diferentes tecidos (endosperma, perisperma, folha, pistilo, estame e raiz), obtidos a partir de dados de RNA-Seq de <i>C. canephora</i>. As cores mais próximas do vermelho mais intenso indicam maior expressão dos genes <i>DREB</i> conforme os tecidos analisados.</p>	32
Figura 11	<p>Representação em “<i>heatmap</i>” dos valores de expressão dos genes <i>DREB</i> (RPKM) do SG-III de <i>C. canephora</i> em diferentes tecidos (endosperma, perisperma, folha, pistilo, estame e raiz), obtidos a partir de dados de RNA-Seq de <i>C. canephora</i>. As cores mais próximas do vermelho mais intenso indicam maior expressão dos genes <i>DREB</i> conforme os tecidos analisados.</p>	33
Figura 12	<p>Representação em “<i>heatmap</i>” dos valores de expressão dos genes <i>DREB</i> (RPKM) do SG-IV de <i>C. canephora</i> em diferentes tecidos (endosperma, perisperma, folha, pistilo, estame e raiz), obtidos a partir de dados de RNA-Seq de <i>C. canephora</i>. As cores mais próximas do vermelho mais intenso indicam maior expressão dos genes <i>DREB</i> conforme os tecidos analisados.</p>	34
Figura 13	<p>Perfis de expressão dos genes <i>DREB</i> do SG-I de <i>C. canephora</i> em folhas (à esquerda, em fundo branco) e raízes (à direita, em fundo cinza) dos clones tolerantes (14, 73 e 120) e sensível (22) de Conilon submetidos (NI: não irrigado, colunas em preto) ou não (I: irrigado, colunas em branco) à seca, obtidos pela técnica de RT-qPCR. O gene <i>CcUBQ10</i> foi utilizado como gene de referência e</p>	

	14I como amostra de referência. Genes <i>DREB</i> : A= <i>Cc03_g07870</i> , B= <i>Cc05_g06840</i> , C/D= <i>Cc07_g15390</i> , E/F= <i>Cc08_g15980</i>	37
Figura 14	Perfis de expressão dos genes <i>DREB</i> do SG-II de <i>C. canephora</i> em folhas (à esquerda, em fundo branco) e raízes (à direita, em fundo cinza) dos clones tolerantes (14, 73 e 120) e sensível (22) de Conilon submetidos (NI: não irrigado, colunas em preto) ou não (I: irrigado, colunas em branco) à seca, obtidos pela técnica de RT-qPCR. O gene <i>CcUBQ10</i> foi utilizado como gene de referência e 14I como amostra de referência. Genes <i>DREB</i> : A= <i>Cc07_g06220</i> , B/C= <i>Cc10_g04710</i>	39
Figura 15	Perfis de expressão dos genes <i>DREB</i> do SG-III de <i>C. canephora</i> em folhas (à esquerda, em fundo branco) e raízes (à direita, em fundo cinza) dos clones tolerantes (14, 73 e 120) e sensível (22) de Conilon submetidos (NI: não irrigado, colunas em preto) ou não (I: irrigado, colunas em branco) à seca, obtidos pela técnica de RT-qPCR. O gene <i>CcUBQ10</i> foi utilizado como gene de referência e 14I como amostra de referência. Genes <i>DREB</i> : A= <i>Cc02_g03420</i> , B/C= <i>Cc02_g024810</i> , D = <i>Cc08_g13960</i> , E= <i>Cc08_g13970</i>	41
Figura 16	Perfis de expressão dos genes <i>DREB</i> do SG-IV de <i>C. canephora</i> em folhas (à esquerda, em fundo branco) e raízes (à direita, em fundo cinza) dos clones tolerantes (14, 73 e 120) e sensível (22) de Conilon submetidos (NI: não irrigado, colunas em preto) ou não (I: irrigado, colunas em branco) à seca, obtidos pela técnica de RT-qPCR. O gene <i>CcUBQ10</i> foi utilizado como gene de referência e 14I como amostra de referência. Genes <i>DREB</i> : A/B= <i>Cc10_g14160</i>	43

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	Microlitro
A	Absorbância
ABA	Ácido abcísico
ABRE	<i>ABA-responsive element</i>
AP2	APETALA 2
APX	<i>Ascorbate peroxidase</i>
bZIP	<i>Basic leucine zipper</i>
C.	<i>Coffea</i>
Cc	<i>Coffea canephora</i>
CAT	<i>Catalase</i>
cDNA	DNA complementar
CO ₂	Dióxido de Carbono
C _T	Ciclo <i>Threshold</i>
DRE	<i>Drought response element</i>
DREB	<i>Dehydration responsive element binding protein</i>
ERF	<i>Ethylene-responsive element binding factor</i>
F	<i>Forward</i>
FTs	Fatores de transcrição
GCs	Genes candidatos
GPX	<i>Guaiacol-type peroxidase</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
I	Irigado
INDELS	<i>Insertion/ deletions</i>
LEA	<i>Late embryogenesis abundant proteins</i>
M	Molar
MAP	<i>Mitogen activated protein</i>
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MYB	<i>Myeloblastosis oncogene</i>
MYC	<i>Myelocytomatosis oncogene</i>
NI	Não irrigado
NTC	<i>No template control</i>
O ₂	Oxigênio
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
R	<i>Reverse</i>
RPKM	<i>Reads per kilo base per million mapped reads</i>
RT-qPCR	<i>Reverse transcription-quantitative PCR</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SG	Subgrupo
SNPs	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
SOD	<i>Superoxide dismutases</i>
SPS	<i>Sucrose-phosphate synthase</i>

SuSy	<i>Sucrose synthase</i>
T _m	<i>Melting temperature</i>
UBQ	Gene da ubiquitina

LISTA DE SIGLAS

CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
ICO	International Coffee Organization
INCAPER	Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
UFV	Universidade Federal de Viçosa

LISTA DE SÍMBOLOS

A	<i>Net CO₂ assimilation rate</i>
C_i/C_a	<i>Internal to ambient CO₂ concentration ratio</i>
Ψ_{pd}	<i>Pre-dawn leaf water potential</i>
MPa	Megapascal
x	Vezes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1	Origem da cultura cafeeira	4
2.2	Importância econômica	4
2.3	Taxonomia e características de <i>Coffea</i>	5
2.4	Desafios climáticos para a cultura cafeeira	8
2.5	Respostas aos estresses abióticos em <i>C. canephora</i>	10
2.5.1	Respostas morfológicas.....	10
2.5.2	Respostas fisiológicas	11
2.5.3	Respostas bioquímicas	11
2.5.4	Respostas moleculares	15
2.6	Fatores de transcrição.....	17
2.6.1	DREB como regulador essencial das respostas aos estresses abióticos.....	18
2.6.2	Gene <i>DREB</i> em <i>C. canephora</i>	20
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1	Material vegetal.....	24
3.2	Tratamento com DNase	25
3.2.1	Transcriptase Reversa	25
3.3	Desenho dos pares de <i>primers</i>	26
3.4	Expressão gênica <i>in silico</i>	26
3.5	RT-qPCR	27
3.5.1	Testes preliminares	28
3.5.2	Expressão gênica por RT-qPCR.....	28
3.6	Eficiência dos <i>primers</i>	29
4	RESULTADOS	30
4.1	Expressões <i>in silico</i> dos genes da subfamília <i>DREB</i> de <i>C. canephora</i> nas folhas e raízes	30
4.1.1	Expressões <i>in silico</i> dos genes <i>DREB</i> do subgrupo I.....	30
4.1.2	Expressões <i>in silico</i> dos genes <i>DREB</i> do subgrupo II	31
4.1.3	Expressões <i>in silico</i> dos genes <i>DREB</i> do subgrupo III.....	32
4.1.4	Expressões <i>in silico</i> dos genes <i>DREB</i> do subgrupo IV	33
4.2	Expressões dos genes da subfamília <i>DREB</i> de <i>C. canephora</i> em resposta à seca nas folhas e raízes pela RT-qPCR	35
4.2.1	Expressões <i>in vivo</i> dos genes <i>DREB</i> do subgrupo I.....	35
4.2.2	Expressões <i>in vivo</i> dos genes <i>DREB</i> do subgrupo II	38
4.2.3	Expressões <i>in vivo</i> dos genes <i>DREB</i> do subgrupo III.....	39
4.2.4	Expressões <i>in vivo</i> dos genes <i>DREB</i> do subgrupo IV	42

5	DISCUSSÃO.....	44
5.1	Comparações das expressões <i>in silico</i> e <i>in vivo</i> dos genes <i>DREB</i>.....	44
5.2	Análises das expressões <i>in vivo</i> dos GCs dos subgrupos I e II em resposta à seca	45
5.3	Análises das expressões <i>in vivo</i> dos GCs dos subgrupos III e IV em resposta à seca	46
5.4	Análise dos GCs mais expressos nos clones tolerantes em resposta à seca	47
5.5	Análise dos GCs mais expressos em folhas em resposta à seca.....	49
5.6	Considerações finais e perspectivas.....	49
6	Conclusões	49
	REFERÊNCIAS.....	53
	APÊNDICES	65
	ANEXO	72

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o maior produtor (INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION - ICO¹, 2016a) e exportador de café do mundo (ICO², 2016b). No país, essa cultura se tornou uma das “*commodities*” agrícolas mais importantes, sendo o quinto item agrícola mais exportado (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA³, 2015).

As espécies de cafeeiros, *Coffea arabica* e *C. canephora* são as que possuem maior importância econômica e o Conilon é o mais amplamente cultivado de *C. canephora* no Brasil (FERRÃO et al., 2007). *C. canephora* Conilon apresenta grande variabilidade genética em produtividade, maior resistência a pragas, tolerância a doenças (SOUZA et al., 2004) e principalmente, tolerância à seca. A sua importância se deve ao seu volume de produção e valor industrial (FASSIO; SILVA 2007), sendo muito utilizado na fabricação de cafés solúveis e em misturas com o café Arábica.

No entanto, grande parte da produção cafeeira é limitada por estresses abióticos, como a seca, considerada o principal estresse que afeta a produção no Brasil (PINHEIRO et al., 2005). Essa limitação na produção tende a aumentar em função das mudanças climáticas reconhecidas mundialmente (BUNN et al., 2015) e também porque no Brasil, o cultivo de Conilon tem-se expandido para áreas onde a deficiência hídrica é o principal fator limitante à produção (SILVA et al., 2010). Nessas regiões sem irrigação, os rendimentos da produção podem

¹INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. **Total production by all exporting countries**. ICO. 2016a. Disponível em: <<http://www.ico.org/prices/po-production.pdf>>. Acesso em: 5 fev. 2016.

²_____. **Monthly export statistics** - January 2016. 2016b. Disponível em: <<http://www.ico.org/prices/m1-exports.pdf>>. Acesso em: 5 fev. 2016.

³MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. MAPA. **Informes Estatísticos do Café 2014- 2015**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/estatisticas>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

ser reduzidos em até 80% em anos muitos secos (DAMATTA; RAMALHO, 2006). Esses estresses, que prejudicam o crescimento das plantas e a sua produtividade, geram mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares (AKHTAR et al., 2012).

Devido à importância socioeconômica do cafeeiro, justificam-se os investimentos nas pesquisas envolvendo a sua adaptação as mudanças climáticas. Assim, a geração de variedades de cafeeiro tolerantes à seca tem se tornado uma das prioridades de muitos institutos de pesquisa.

O Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – INCAPER identificou vários clones de *C. canephora* Conilon tolerantes (clones 14, 73 e 120) e sensível (clone 22) ao déficit hídrico (FERRÃO et al., 1999). Através do Projeto Genoma Café Brasileiro (VIEIRA et al. 2006; MONDEGO et al. 2011), foram caracterizados genes candidatos (GCs) que apresentaram expressão diferencial em folhas dos clones 14, 22, 73 e 120 de *C. canephora* Conilon cultivado em casa de vegetação com ou sem limitação hídrica (MARRACCINI et al., 2012; VIEIRA et al., 2013). Um desses GCs é o gene *CcDREB1D* de *C. canephora*, cuja expressão foi maior nas folhas dos clones tolerantes comparada com o clone sensível sob condição de déficit hídrico (MARRACCINI et al., 2012; VIEIRA et al., 2013). Essa diferença no nível de expressão do gene *CcDREB1D* entre esses clones sugere que o mesmo pode participar nos mecanismos regulatórios de resposta à seca (ALVES, 2015).

Os genes *DREB* (“*dehydration responsive element binding protein*”) são importantes fatores de transcrição (FTs) que induzem um conjunto de genes responsivos ao estresse abiótico e contribuem para as respostas das plantas a esses estresses (LATA; PRASAD, 2011).

Com o recente sequenciamento completo do genoma de *C. canephora* (DENOEUDE et al., 2014), foi possível a identificação dos membros da subfamília *DREB* de *C. canephora*, os quais foram divididos em quatro

subgrupos (SGs) por Alves (2015). O acesso a esses dados foi facilitado por um sistema integrativo de informação do genoma, Coffee Genome Hub (DEREEPER et al., 2015).

Com base nessas informações e nos poucos estudos sobre os genes *DREB* em resposta à seca em *C. canephora*, os quais poderão ser GCs para futuros programas de melhoramento genético em cafeeiro visando tolerância à seca, este trabalho objetiva analisar a expressão *in silico* dos genes da subfamília *DREB* dessa espécie nas folhas e raízes para posterior validação desses genes de clones de *C. canephora* Conilon tolerantes e sensíveis à seca submetidos ou não a um déficit hídrico pela técnica de RT-qPCR (“*reverse transcription-quantitative PCR*”).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Origem da cultura cafeeira

O cafeeiro é uma planta natural dos estepes da Etiópia e o consumo da bebida iniciou também na África, passando aos persas e aos árabes, os quais a divulgaram a partir do século XV. Com isso, as sementes se espalharam por todo o mundo islâmico e europeu (OLIVEIRA et al., 2012).

No Brasil, essa cultura chegou por meio de sementes em Belém, no Estado do Pará, em 1727, enviadas da Guiana Francesa pelo Sargento-Mor Francisco de Mello Palheta (MARTINS, 2008). As primeiras sementes de *C. canephora* no Espírito Santo chegaram aproximadamente em 1912, no entanto, os agricultores migraram para o seu plantio apenas na década de 60 (FONSECA et al., 2007).

2.2 Importância econômica

A produção mundial de café em 2015/2016 é estimada em cerca de 143,4 milhões de sacas de 60 quilos de café beneficiados, 1,4% a mais em relação à 2014/2015 (ICO⁴, 2016c). Desse total, a produção esperada de *C. arabica* é a de se manter inalterada, com 84,3 milhões de sacas, e a de *C. canephora* apresentar um aumento de 3,7% (ICO⁴, 2016c).

No Brasil, estima-se que a produção da safra de *C. arabica* e *C. canephora* em 2016 será entre 49,13 e 51,94 milhões de sacas, sendo que o café

⁴INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. ICO. **Coffee prices maintain downward trend as 2015/16 production estimates show slight recovery.** 2016c. Disponível em: <<http://icocoffeeorg.tumblr.com/post/137284269750/coffee-prices-maintain-downward-trend-as-2015-16>>. Acesso em: 25 jan. 2016.

Conilon representa 23,2%, um crescimento entre 1,8 e 8% (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB⁵, 2016).

No estado do Espírito Santo, o maior produtor nacional de café Conilon, a previsão para a safra cafeeira está estimada entre 10,82 e 11,50 milhões de sacas e deste quantitativo, cerca de 7,7 milhões de sacas (68,95%) serão de café Conilon (CONAB⁵, 2016).

Em termos de geração de divisas na balança comercial brasileira, o café ficou em quinto lugar no ranking das exportações, o que corresponde a 7% das exportações do agronegócio nacional (MAPA³, 2015). Já em relação ao consumo interno, o Brasil consumiu 21 milhões de sacas, próximo do maior consumidor mundial, os EUA, cujo consumo foi entre 23 e 24 milhões de sacas por ano (MAPA³, 2015).

2.3 Taxonomia e características de *Coffea*

O cafeeiro pertence à ordem *Gentianales*, família *Rubiaceae*, subfamília *Ixoroideae* e a tribo *Coffea*, composta pelo gênero *Psilanthus* e *Coffea*, sendo que o gênero *Coffea* L. possui aproximadamente 124 espécies (DAVIS et al., 2011). Duas espécies têm importância comercial: *Coffea arabica* L., conhecida como Arábica e *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner, como Robusta (LEROY et al., 2014). O nome Robusta advém da expressão rusticidade e indica resistência as doenças das plantas (FERRÃO et al., 2007). Em nível mundial é considerada a espécie mais amplamente cultivada de *C. canephora* no mundo e no Brasil, *C. canephora* cultivado é conhecido como Conilon.

⁵COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: café. **Observatório Agrícola**, v. 2, n. 1, 2016. Disponível em: <<http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/levantamento/2016-levantamento-de-safra-1.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

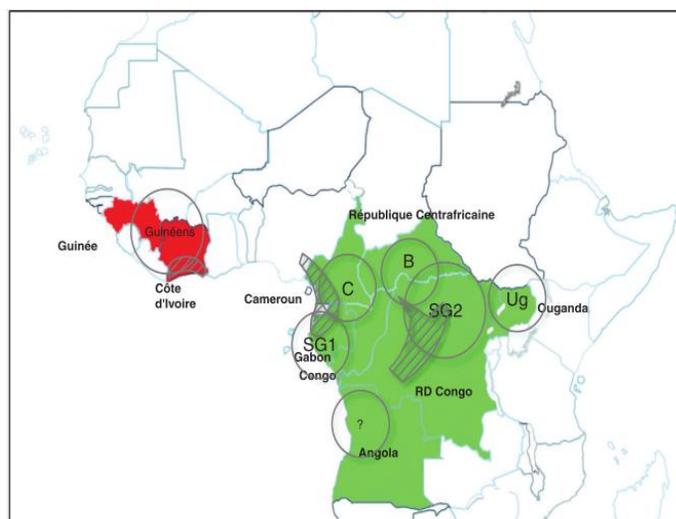


Figura 1 Origem geográfica dos principais grupos genéticos de *Coffea canephora*. Em vermelho, origem geográfica do *pool* Guineano e em verde, origem geográfica dos grupos genéticos do *pool* Congolês.
 Fonte: Montagnon et al. (2012).

Essa espécie é diploide ($2n=2x=22$ cromossomos), alógama, perene, de porte arbustivo, caule lenhoso (FERRÃO et al., 2007) e possui alta variabilidade genética. Sua origem é de regiões de baixas altitudes, altas temperaturas e umidade do continente africano, compreendendo uma faixa que se estende de Guiné e Costa do Marfim (grupo Guineano), República Democrática do Congo, República Centro Africano e Camarões (grupo Congolês) (MONTAGNON et al., 1998).

O grupo Congolês é dividido em quatro SGs conforme suas origens geográficas (Figura 1): SG1 (Gabão e Congo), SG2 (República Democrática do Congo), B (República Centro-Africana) e C (Camarões) (MONTAGNON et al., 2012).

As plantas de Conilon destacam-se pela grande variabilidade genética em produtividade, maturação, porte, características de frutos, grãos e resistência

a pragas e doenças e tolerância à seca (SOUZA et al., 2004; MONTAGNON, 2000). As mesmas análises genéticas revelaram que o Conilon do Brasil pertence ao SG1 (MONTAGNON et al., 2012; ALEKCEVETCH, 2013).

Diante da importância do Conilon e o fato de que a sua produção poderia ser mais expressiva se condições desfavoráveis não ocorressem, principalmente como o suprimento de água (RODRIGUES et al., 2015), pesquisas vêm sendo realizadas com o Conilon em relação a tolerância à seca (DAMATTA et al., 2003; DAMATTA, 2004; PINHEIRO et al., 2004).

Diferentemente de *C. canephora*, *C. arabica* é nativo das terras altas da Etiópia (SOUZA et al., 2004) e apresenta níveis de produção geralmente afetados por doenças graves e pragas como a ferrugem da folha (*Hemileia vastatrix* Berk et Br.), antracnose dos frutos de café (*Colletotrichum kahawae* Waller et Bridge), broca do caule (*Xylotrechus quadripes* Chevrolat) e nematoides (*Meloidogyne* sp. e *Pratylenchus* sp.) (PRAKASH et al., 2005).

C. arabica é uma espécie tetraploide ($2n = 4x = 44$) derivada da hibridização natural entre duas espécies diploides (Figura 2): *C. eugenioides* e *C. canephora* (LASHERMES et al., 1999). As principais cultivares de *C. arabica*, como Mundo Novo, Catuaí e Caturra, foram derivadas de duas populações base, “Typica” ou “Bourbon” (ANTHONY et al., 2002), o que resultou em uma baixa diversidade genética entre as plantas cultivadas de *C. arabica* (MISHRA; SLATER, 2012).

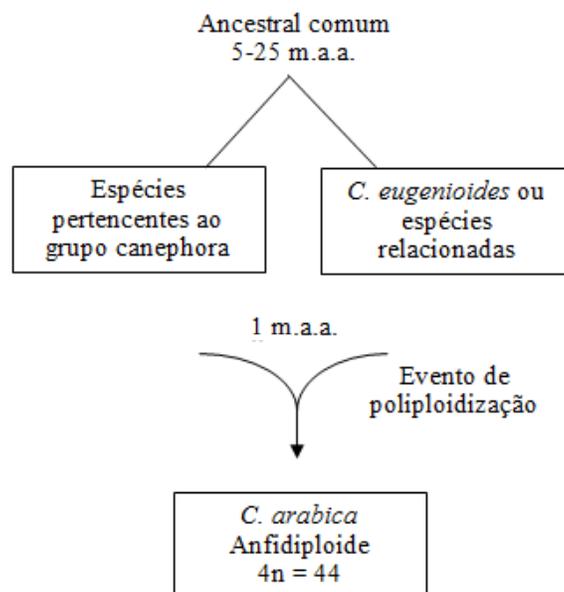


Figura 2 Origem de *C. arabica*. Os genomas progenitores são representados pelas espécies diploides *C. eugenioides* e *C. canephora*. *C. arabica* surgiu entre 1 e 2 milhões de anos atrás (m.a.a.) a partir da fusão de *C. canephora* (ou espécies relacionadas) e *C. eugenioides*.

Fonte: Adaptado de Vidal et al. (2010).

2.4 Desafios climáticos para a cultura cafeeira

Estresses abióticos como a salinidade, a seca e a temperatura representam a principal causa de perdas de culturas no mundo (AGARWAL; JHA, 2010). Desses estresses, as condições de temperatura, quantidade e padrão de chuva são fatores importantes no rendimento do cafeeiro, os quais interferem na sua produtividade e qualidade (SANTOS et al., 2015).

A quantidade de água disponível para a irrigação tem diminuído de forma constante, especialmente nos anos mais secos de muitas regiões brasileiras que cultivam cafeeiros (SILVA et al., 2013). Assim, a tendência é que as limitações hídricas, devido às mudanças climáticas, agravem ainda mais o

rendimento dessa cultura. Segundo as previsões do Intergovernmental Panel on Climate Change – IPCC⁶ (2015), a média da temperatura da superfície global deverá aumentar ao longo do século XXI em torno de 0,3°C a 0,7°C no período de 2016-2035 em relação a 1986-2005. Juntamente com uma maior temperatura, haverá aumento na sazonalidade da precipitação, o que reduzirá a adequação climática (OVALLE-RIVERA et al., 2015) para *C. canephora* em regiões importantes, como o Brasil (BUNN et al., 2015).

Na principal área produtora de *C. canephora*, o Estado do Espírito Santo, há um aumento na tendência da expansão do seu cultivo em direção as regiões marginais e degradadas, onde a disponibilidade de água constitui um dos principais problemas (DAMATTA et al., 2003). Na produção de Conilon houve queda significativa em 2015 e 2016 devido à seca e a má distribuição de chuvas por dois anos consecutivos e as consequências dos problemas associados às mudanças climáticas aconteceram em todas as regiões produtoras (CONAB⁵, 2016).

Diante desses estresses que provocam uma grande variedade de respostas no cafeeiro e dos novos desafios climáticos, os requisitos ótimos de cultivo são prováveis de se tornarem muito difíceis, o que leva, portanto, a redução na produtividade, aumenta e intensifica o uso de irrigação e algumas áreas se tornam impróprias para o cultivo de cafeeiro (DAVIS et al., 2012). Como alternativa a essa situação, o futuro da cultura de café depende de pesquisas que preveem a seleção e o melhoramento de plantas mais adaptadas às novas mudanças climáticas previstas (SANTOS et al., 2015).

⁶INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Climate Change 2014**: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Core writing team, Pachauri, R. K.; Meyer, L. A. IPCC, 2014. Disponível em: <https://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/syr/SYR_AR5_FINAL_full.pdf>. Acesso em: 5 jun. 2015.

2.5 Respostas aos estresses abióticos em *C. canephora*

As plantas geralmente respondem as mudanças ambientais de um modo complexo e integrado, permitindo responderem e se adaptarem a um conjunto específico de condições e restrições presentes em um determinado momento (LATA; PRASAD, 2011). Essas respostas aos estresses abióticos são através de mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares (AKHTAR et al., 2012), as quais serão abordadas somente para *C. canephora*, cuja espécie é o alvo de estudo deste trabalho.

2.5.1 Respostas morfológicas

C. canephora é cultivada em locais com a média anual entre 22 e 26°C (MENDES et al., 2002). Em temperaturas acima de 23°C, o desenvolvimento e o amadurecimento dos frutos são acelerados, o que leva geralmente a perda da qualidade da bebida (CAMARGO, 1985). A exposição contínua a temperaturas elevadas como 30°C leva a um estresse, que se manifesta em crescimento reduzido e anormalidade, como o amarelecimento das folhas e crescimento de tumores no caule (FRANCO, 1958). Em regiões com a temperatura média anual abaixo de 17-18°C, o crescimento também é reduzido (DAMATTA; RAMALHO, 2006).

Em relação às condições hídricas, *C. canephora* é adaptada a regiões com uma precipitação abundante superior a 2000 mm distribuídos no período de 9 a 10 meses (COSTE, 1992). Sob condições moderadas de déficit hídrico, a fotossíntese é reduzida devido principalmente ao fechamento estomático (PINHEIRO et al., 2004). Conforme o estresse progride, restrições bioquímicas podem limitar a fixação de CO₂ fotossintético mais diretamente (LAWLOR, 1995). A ocorrência de chuvas esporádicas e de baixa intensidade durante o

período de floração e, particularmente, em relação às fases posteriores do desenvolvimento do botão floral, é considerada um dos grandes fatores responsáveis pelo amadurecimento do fruto dessincronizado (DAMATTA et al., 2007).

Para melhorar o desempenho de Conilon em regiões sujeitas à seca, uma estratégia é através da identificação de materiais genéticos com maior potencial de tolerância à seca (RONCHI; DAMATTA, 2007). Baseado nisso, o INCAPER identificou clones de *C. canephora* Conilon tolerantes (14, 73 e 120) e sensível (22) ao déficit hídrico (FERRÃO et al., 1999). Entre os clones de Conilon avaliados quanto à produção sob condições de seca, os clones sensíveis à seca apresentam baixo vigor, desfolha considerável e grande comprometimento da produção (SILVA et al., 2010). Já a tolerância à seca pode estar relacionada ao maior desenvolvimento do sistema radicular, o que permite adiar a desidratação dos tecidos (DAMATTA et al., 2003).

2.5.2 Respostas fisiológicas

O fechamento estomático de Conilon é considerado o indicador primário do déficit hídrico (DAMATTA, 2004). A condutância estomática decresce curvilinearmente com a redução da disponibilidade hídrica, sugerindo alta sensibilidade estomática ao desenvolvimento de déficit hídrico no cafeeiro (PINHEIRO et al., 2005).

Os clones tolerantes podem apresentar estômatos fechados, o que limita a transpiração e o influxo de CO₂ para a fotossíntese (RONCHI; DAMATTA, 2007). Além disso, também apresentam sistemas radiculares relativamente profundos (clones 14 e 120: Figura 3) e sensibilidade estomática satisfatória à disponibilidade de água, mas com alta condutância hidráulica.

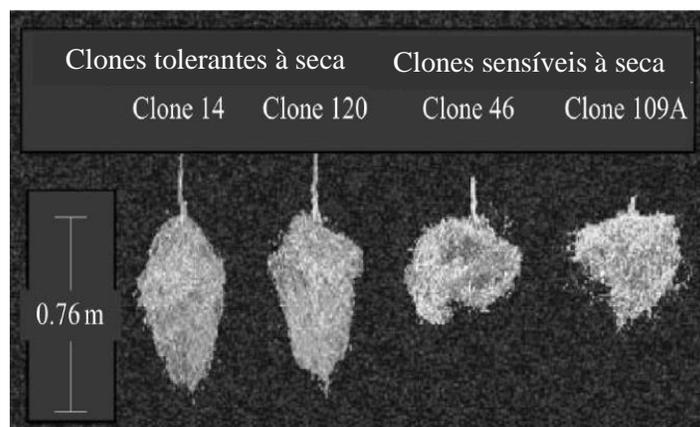


Figura 3 Sistemas de raízes de clones tolerantes (14 e 120) e sensíveis (46 e 109A) de *C. canephora* cultivados com total irrigação.

Fonte: Adaptado de Pinheiro et al. (2005).

Entre os clones tolerantes à seca, 14, 73 e 120, existem diferentes comportamentos devido o decréscimo de Ψ_{pd} (“*pre-dawn leaf water potential*”) e também em relação ao clone sensível. (MARRACCINI et al., 2011). Os clones 14/120 e 73 apresentaram Ψ_{pd} de aproximadamente -3,0 MPa após 12 e 15 dias, respectivamente, de suspensão hídrica, enquanto que para o clone sensível, 22, o mesmo valor de Ψ_{pd} foi observado após 6 dias. Esses resultados sugerem que os clones tolerantes apresentam diferentes mecanismos que podem garantir a sua maior tolerância à seca (Figura 4).

O clone 73 apresenta menores valores de g_s (“*stomatal conductance to water vapor*”), A (“*net CO₂ assimilation rate*”) e menor decréscimo de Ψ_{pd} , devido a sua maior eficiência em controlar o fechamento estomático e a transpiração (VIEIRA et al., 2013). No entanto, esse clone não apresenta uma redução de C_i/C_a (“*internal to ambient CO₂ concentration ratio*”) sob a seca, diferentemente dos outros clones (MARRACCINI et al., 2012).

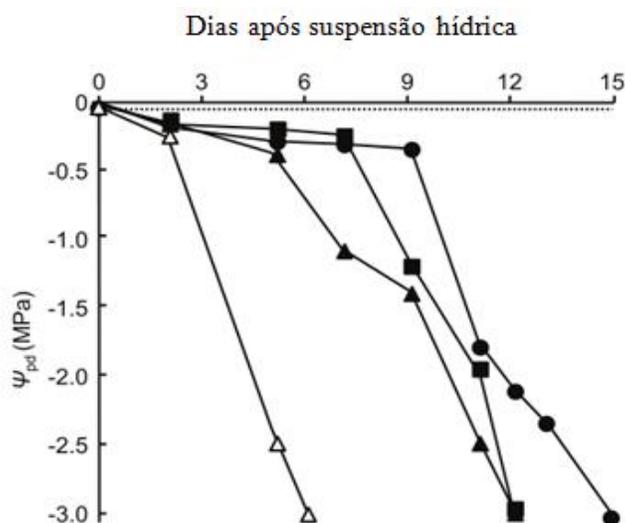


Figura 4 A evolução de Ψ_{pd} (“pre-dawn leaf water potential”) nas folhas de *C. canephora*. Os clones 14, 22, 73 e 120 de *C. canephora* Conilon foram cultivados em casa de vegetação sob déficit hídrico. Para cada clone, as evoluções de Ψ_{pd} são apresentadas conforme os dias após suspensão hídrica (Δ, clone 22-NI; ▲, 14-NI; ■, 120-NI; ●, 73-NI).

Fonte: Adaptado de Marraccini et al. (2011).

Já os clones sensíveis ao déficit hídrico possuem um controle deficiente da transpiração, com os estômatos respondendo de forma limitada à redução da disponibilidade de água do solo, e também possuem uma baixa capacidade de absorção de água, pois possuem sistemas radiculares mais superficiais, como os clones 46 e 109A da Figura 3 (RONCHI; DAMATTA, 2007). O clone 22 possui menor eficiência em controlar o fechamento estomático e a transpiração do que os clones tolerantes 14 e 120. Além disso, apresenta um rápido declínio de Ψ_{pd} e grande redução de A sob a seca (MARRACCINI et al., 2012).

Como o fechamento estomático reduziu mais a transpiração do que a fotossíntese, os clones 14 e 120 possuem maior eficiência no uso da água do que o clone 22.

Avaliações fisiológicas sugerem, portanto, que os clones com produção relativamente elevada sob a seca são devido à manutenção de status hídrico adequado via combinação de sistemas radiculares profundos, controle estomático satisfatório da transpiração e manutenção da área foliar (RONCHI; DAMATTA, 2007).

2.5.3 Respostas bioquímicas

Além das avaliações fisiológicas, as características bioquímicas são também importantes para os clones com produção relativamente elevada sob a seca, como a existência de um sistema antioxidante mais robusto (RONCHI ; DAMATTA, 2007).

As condições de déficit hídrico causam uma perturbação na homeostase osmótica e iônica das células vegetais (BARTELS; SUNKAR, 2005). Isso geralmente é resultado da produção de ROS (“*reactive oxygen species*”) e da acumulação de radicais livres seguidos de peroxidação lipídica, danos de membrana e inativação de enzimas, que influenciam assim a viabilidade celular.

Para lidar com ROS, as plantas são dotadas de um complexo sistema antioxidante enzimático incluindo SOD (“*superoxide dismutases*”), que catalisa a reação de O_2 para H_2O_2 ; CAT (“*catalase*”) e APX (“*ascorbate peroxidase*”) detoxificam a produção de H_2O_2 (ASADA, 1999; MITTLER, 2002).

O aumento da atividade de enzimas antioxidantes pode estar associado com a tolerância à seca em *C. canephora* (LIMA et al., 2002). Os clones tolerantes à seca apresentam mecanismos de defesa mais eficazes para eliminar ROS do que os sensíveis (PINHEIRO et al., 2004), sendo a alta atividade de SOD considerada a responsável pela proteção contra o estresse oxidativo (LIMA et al., 2002).

Outra resposta bioquímica à seca é através do metabolismo de açúcares, como a atividade da enzima chave na síntese da sacarose, SPS (“*sucrose-phosphate synthase*”) (CHAITANYA et al., 2003; WIDODO et al., 2003). A tolerância à seca do clone 120 pode estar relacionada com a manutenção da atividade de SPS sob crescente déficit hídrico foliar (PRAXEDES et al., 2006).

Além dessa enzima, outras duas são fundamentais na utilização da sacarose, invertase e SuSy (“*sucrose synthase*”), que geralmente aumentam sob restrição hídrica e podem ser responsáveis por uma acumulação de hexoses (KELLER; LUDLOW, 1993; PELLESCI et al., 1997). A acumulação de açúcares solúveis e aminoácidos induzida pela seca podem contribuir para manter a produtividade dos clones tolerantes ao contrário dos sensíveis (PRAXEDES et al., 2006).

2.5.4 Respostas moleculares

Compreender os mecanismos moleculares na resposta à seca é fundamental na tentativa de aumentar a tolerância a esse estresse por meio de técnicas moleculares (NAKASHIMA et al., 2014). As respostas moleculares consistem na percepção desses desequilíbrios, na transdução do sinal, na expressão gênica, nas mudanças metabólicas na planta, reestabelecendo assim a homeostase celular (WANG et al., 2006).

Os produtos dos genes que normalmente estão em silêncio e são ativados sob condições de estresse osmótico podem ser classificados em dois grupos (SEKI et al., 2002) (Figura 5). O primeiro deles inclui genes que codificam importantes proteínas que protegem as células e tecidos de condições estressantes (MA; QIN, 2014). Proteínas essas como as LEA (“*late embryogenesis abundant proteins*”), proteínas anticongelantes, chaperonas moleculares, enzimas chave para a biossíntese de osmólitos (prolina, açúcar,

álcoois de açúcar, betaínas), enzimas de detoxificação, proteínas de canais de água e transportadores de membrana (AKHTAR et al., 2012).

O segundo grupo inclui genes que codificam proteínas regulatórias para modular a expressão de genes *downstream* em resposta as condições estressantes (MA; QIN, 2014). São incluídos neste grupo vários fatores de transcrição (FTs), como MYC (“*myelocytomatosis oncogene*”), MYB (“*myeloblastosis oncogene*”), bZIP (“*basic leucine zipper*”) e DREB, sugerindo o papel de vários mecanismos regulatórios de transcrição nas vias de transdução do sinal (AGARWAL et al., 2006; SHINOZAKI; YAMUGUCHI-SHINOZAKI, 2007).

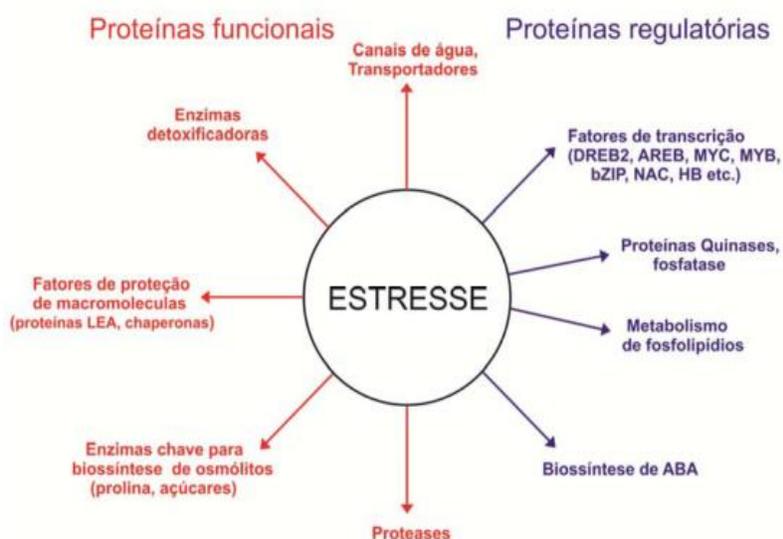


Figura 5 Genes induzidos durante o déficit hídrico e frio e suas possíveis funções na tolerância e resposta ao estresse.

Fonte: Adaptado de Yamaguchi-Shinozaki; Shinozaki (2006).

Na tentativa de compreender o determinismo genético da tolerância à seca em cafeeiro recentes estudos identificaram mais de quarenta GCs que apresentam perfis de expressão diferencial em folhas (VINECKY et al. 2012;

MARRACCINI et al. 2012; VIEIRA et al. 2013) e raízes (COSTA, 2014) de clones tolerantes e sensíveis à seca de *C. canephora* Conilon, cultivados em casa de vegetação e submetidos ou não a um déficit hídrico. Entre esses GCs destaca-se o FT DREB, que apresentou maior expressão em condições de seca.

2.6 Fatores de transcrição

Importantes avanços têm sido alcançados no entendimento das alterações transcricionais induzidas pelas restrições ambientais e na identificação de FTs (MAZZUCOTELLI et al., 2008). Esses fatores são tipos específicos de proteínas que se ligam ao DNA (ASHRAF, 2010) e no genoma das plantas há uma grande porção de genes envolvidos na transcrição (HUSSAIN et al., 2011).

Essas proteínas ativam cascatas ou redes inteiras de genes que atuam juntos no aumento da tolerância em relação a múltiplos estresses de uma só vez (AKHTAR et al., 2012). O controle da expressão funcional dos genes realizado pelos FTs (SHARMA et al., 2010) ocorre através da regulação da expressão de genes *downstream* pelos elementos *trans*-atuantes, que se ligam especificamente aos elementos *cis*-atuantes nos promotores dos genes alvos (MIZOI et al., 2012). A regulação da transcrição depende, portanto, da disponibilidade e da capacidade dos FTs se fixarem nos promotores dos elementos regulatórios presentes no promotor e próximo deste (ZOU et al., 2011).

A manipulação dos FTs tem sido muito utilizada para aumentar a tolerância à seca (HUSSAIN et al., 2011) e um número considerável de genes envolvidos nesse estresse tem sido identificado (BARTELS; SUNKAR, 2005), como o gene *DREB*. Esse gene atua nas condições de estresse abiótico e pode ser regulado por sequências específicas a fim de melhorar a aptidão das plantas a uma variedade de condições (MIZOI et al., 2012). Essa propriedade dos FTs

como o DREB, os torna uma categoria atrativa de genes para a manipulação da tolerância ao estresse abiótico (AKHTAR et al., 2012).

2.6.1 DREB como regulador essencial das respostas aos estresses abióticos

Estresses abióticos mediados pela expressão gênica têm sido regulados por diferentes FTs, dos quais as proteínas DREB desempenham um papel chave (NAYAK et al., 2009). A subfamília DREB também referida como proteínas CBF (“*C-repeat binding factor*”), pertence à família AP2/ERF (“*APETALA 2*”/“*ethylene-responsive element binding factor*”), um grande grupo de FTs específicos de plantas (SAKUMA et al., 2002). Esses FTs reconhecem os elementos regulatórios de DNA denominados de DRE (“*drought response element*”), localizados nas regiões promotoras de genes expressos em condições de estresses, e ativam a transcrição dos genes nos quais eles se fixam (KUROMORI et al., 2014).

Para os genes responsivos aos estresses abióticos as cascatas de transdução do sinal desses estresses podem ocorrer pelas vias dependentes ou independentes de ABA (LATA; PRASAD, 2011) e pode haver um “*crosstalk*” entre os elementos dessas vias (NAKASHIMA et al., 2014) (Figura 6). *DREB1* e *DREB2* atuam em uma via independente de ABA, exceto *CBF4* também conhecido com *DREB1D*, que exige os elementos CRT/DRE em uma via dependente de ABA (KHAN, 2011).

Apesar de *DREB1/CBF* e *DREB2* serem bem caracterizados como os principais reguladores positivos das respostas aos estresses abióticos, outros SGs de *DREB* foram relatados em serem responsivos e conferirem tolerância a esses estresses (MIZOI et al., 2012), como os genes A-3, A-4 e A-6.

Baseado nas respostas aos estresses que outros SGs de *DREB* podem apresentar, as características e funções dos membros desses SGs precisam ser mais estudadas (AKHTAR et al., 2012), como já foram iniciadas neste trabalho.

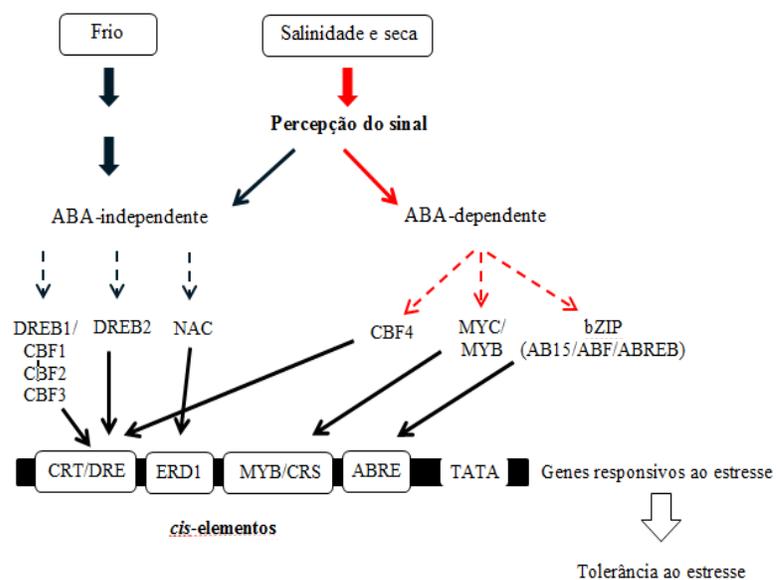


Figura 6 Representação esquemática das vias de transdução do sinal celular que conduzem a partir da percepção do sinal a expressão do gene. Os genes *DREB1/CBF* são induzidos pelo estresse causado pelo frio, enquanto que *DREB2* são induzidos pelos estresses de desidratação e salino. Ambos trabalham em vias independentes de ABA. *CBF4*, *MYC/MYB* e *bZIP* são induzidos pela desidratação/ estresse salino e trabalham em uma via dependente de ABA. *DREB1/CBF* e *DREB2* se ligam ao elemento *cis*-atuante DRE/CRT, *MYC/MYB* e *bZIP* a ABRE.

Fonte: Adaptado de Khan (2011).

Em diversos estudos foram relatadas respostas à seca do gene *DREB* pelas análises de expressão e em plantas transgênicas. A expressão do gene *GmDREB2*, isolado da soja e classificado no SG A-5 de *DREB*, aumentou a tolerância à seca de plantas transgênicas (CHEN et al., 2007). O gene *HvCBF4* da cevada foi transformado em arroz e aumentou a tolerância à seca sem retardo

no crescimento (SE-JUN et al., 2007). O nível de expressão de *DvDREB2A*, isolado de crisântemo, foi significativamente afetado pela seca (LIU et al., 2008). Apesar desses e outros estudos a respeito dos genes *DREB* em resposta à seca em diversas espécies vegetais, são poucos os estudos desses genes em plantas de *C. canephora* nas condições de déficit hídrico.

2.6.2 Gene *DREB* em *C. canephora*

Para identificar os genes envolvidos na tolerância à seca em plantas de cafeeiro diferentes estratégias foram utilizadas (MARRACCINI et al., 2012), como a identificação de GCs através do Projeto Genoma Café Brasileiro (VIEIRA et al., 2006; MONDEGO et al. 2011). O estudo de GCs identificados baseados nas análises de expressão gênica é de grande importância na compreensão do determinismo genético de características de interesse (ALVES, 2015), como a seca.

Dentro dos GCs que apresentaram uma expressão diferencial em folhas de clones de *C. canephora* Conilon tolerantes (14 e 120) e sensível (clone 22) à seca, cultivados em casa de vegetação com irrigação (I) ou sem (NI), foram identificados vários genes codificando para FTs, particularmente o gene *CcDREB1D* (MARRACCINI et al., 2012).

Nos clones de *C. canephora* Conilon tolerantes à seca houve maior expressão de *CcDREB1D* sob déficit hídrico (Figura 7). Entre os clones tolerantes, a expressão desse gene foi maior no clone 14 do que nos clones 73 e 120 (VIEIRA et al., 2013). Comparando-se os níveis de expressão dos clones tolerantes e sensível, a maior expressão sob déficit hídrico foi observada nas folhas de todos os clones tolerantes (MARRACCINI et al., 2012). Essa diferença no nível de expressão de *CcDREB1D* entre os diferentes clones sugere

que esse gene pode participar no determinismo genético dos clones tolerantes em respostas à seca.

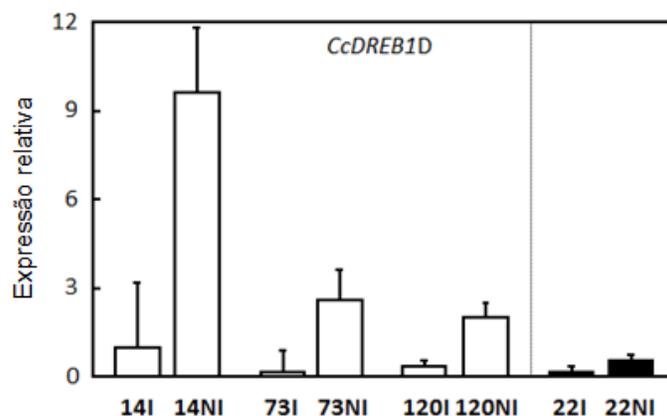


Figura 7 Expressão do gene *CcDREB1D* nas folhas dos clones 14, 73 e 120 (tolerantes) e 22 (sensível) de *C. canephora* submetidos (NI: Não Irrigado) ou não (I: Irrigado) ao déficit hídrico. A expressão desse gene foi analisada por qPCR. O gene *CcUBQ10* foi utilizado como gene de referência e 14I como amostra de referência.

Fonte: Adaptado de Marraccini et al. (2012) e Vieira et al. (2013).

O gene *CcDREB1D* e demais membros da subfamília *DREB* de *C. canephora* foram identificados e divididos em quatro SGs: I, II, III e IV (Figura 8) por Alves (2015). Essa identificação foi possível graças ao sequenciamento completo do genoma de *C. canephora* (DENOEUUD et al., 2014), cuja informação foi disponibilizada em um sistema integrativo de informação do genoma, o Banco de Dados Coffee Genome Hub (DEREEPER et al., 2015).

Diante da importância socioeconômica de *C. canephora*, dos impactos já gerados pelas mudanças climáticas e da tendência de se tornarem cada vez mais corriqueiros, tanto em nível nacional como mundial, desenvolver plantas tolerantes à seca tem se tornado um dos objetivos de muitos institutos de pesquisa. Os genes *DREB* e em especial, *CcDREB1D*, que apresentou diferença

no nível de expressão entre os clones tolerantes e sensível à seca, são possivelmente GCs para futuros programas de melhoramento genético em cafeeiro.

Com base nessas informações e na identificação dos membros da subfamília *DREB* de *C. canephora*, objetiva-se analisar a expressão dos genes *DREB*, pertencentes aos quatro SGs de *C. canephora*, nas folhas e raízes de clones de Conilon tolerantes e sensível à seca, cultivados em condições controladas (casa de vegetação) e submetidos ou não a um déficit hídrico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Genética Molecular da Agência de Inovação do Café (InovaCafé), localizada na Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

3.1 Material vegetal

Os clones tolerantes de *C. canephora* Conilon (14, 73 e 120) e sensível (22) à seca foram obtidos a partir de estacas enraizadas pelo INCAPER (FERRÃO et al., 2000; FONSECA et al., 2004). Esses clones foram cultivados em condições de casa de vegetação (Universidade Federal de Viçosa - UFV) conforme previamente descrito por Marraccini et al. (2012). Após 6 meses, plantas de cada clone foram separadas em dois grupos: o primeiro, controle, recebeu irrigação regular (I: irrigado, $\Psi_{PD} = -0.2$ MPa) enquanto que a irrigação foi suspensa para o segundo grupo (NI: déficit hídrico nas folhas) até as plantas atingirem Ψ_{pd} próximo de $-3,0$ MPa (Figura 4). Para ambas as condições, três plantas (repetições biológicas) foram analisadas.

Folhas expandidas e não danificadas, correspondentes ao terceiro par da extremidade dos ramos plagiotrópicos, e raízes foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80° C para posteriores extrações de RNA. O RNA das folhas e raízes foi extraído com o reagente Trizol[®] (Thermo Fischer Scientific), segundo as recomendações do fabricante. Todo o material biológico foi cedido pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), que obteve o material da UFV.

As amostras de RNAs foram quantificadas no espectrofotômetro NanoVue[™] Plus e a qualidade foi avaliada pela razão de A (absorbância) A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280} . Valores abaixo de 1,8 podem indicar a presença de

contaminação de álcool/açúcar e proteínas, respectivamente, nas amostras de RNA.

As análises de integridade foram realizadas pela eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com 1 μL de Brometo de etídio ($0,5 \mu\text{g. mL}^{-1}$) e posteriormente visualizado no fotodocumentador da Loccus Biotecnologia.

3.2 Tratamento com DNase

As amostras de folhas e raízes foram tratadas com o Kit RQ1 RNase-Free DNase conforme o protocolo do fabricante (Promega, Madison, WI, E.U.A.) para a remoção de DNA genômico das amostras de RNA. As reações foram incubadas no termociclador T100TM Thermal Cycler (Bio-Rad) a 37°C por 30 minutos. Para inativar a enzima, foi adicionado 1 μL de RQ1 RNase Stop Solution (EGTA 20 mM, pH 8) e a reação foi incubada a 65°C por 10 minutos.

3.2.1 Transcriptase Reversa

Para a síntese reversa da primeira fita de cDNA (DNA complementar) foram utilizados 4 μL de RNA tratado com DNase e 1 μL de *primer* oligo dT (Sigma-Genosys) a 10 μM . A reação foi incubada por 5 minutos a 70°C e 5 minutos a 4°C para a desnaturação das estruturas secundárias e o anelamento dos *primers* ao RNA. Após isso, foi utilizado o kit ImProm-IITM Reverse Transcription System de acordo com as instruções do fabricante (Promega). A reação foi incubada a 25°C por 5 minutos para a etapa de anelamento do oligo dT, 42°C por 60 minutos para a etapa de extensão e 70°C por 15 minutos para a inativação da transcriptase reversa. As amostras foram armazenadas a -20°C até serem analisadas quanto a expressão gênica pela técnica RT-qPCR.

3.3 Desenho dos pares de *primers*

A partir do Banco de Dados Coffee Genome Hub (<http://coffee-genome.org/>) foram obtidas as sequências codantes de todos os genes da subfamília *DREB* de *C. canephora* e utilizadas para desenhar os pares de *primers* (F – *forward* e R – *reverse*) no *software* “Primer Express 3.0” (Applied Biosystems). O parâmetro alterado nesse *software* foi o “*Minimum Amplified Region Length*” para obter amplicons com tamanhos entre 70 e 110 pb, optando-se por usar o menor tamanho do fragmento a ser amplificado e valor para a penalidade. Os nomes dos *primers* desenhados (Tabela 1, APÊNDICE A) se referem aos nomes dos genes identificados por Alves (2015) (Figura 7), exceto pelo sufixo COFCA.

Com as sequências dos amplicons de todos os genes *DREB* foi feito um alinhamento múltiplo pelo *software* MAFFT (“*Multiple Alignment using Fast Fourier Transform*”) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>) para verificar se os desenhos dos pares de *primers* estavam em regiões significativamente diferentes entres os genes *DREBs* homeólogos e parálogos de *C. canephora*.

Os pares de *primers* foram sintetizados pela empresa Sigma-Aldrich® e ressuspendidos em água Milli-Q para a manutenção da solução estoque (100 µM) e posteriores diluições (10 µM) a serem utilizados nos experimentos de RT-qPCR.

3.4 Expressão gênica *in silico*

A partir do Banco de Dados Coffee Genome Hub (<http://coffee-genome.org/>), foi feita a expressão gênica *in silico* para todos os 31 genes da subfamília *DREB* de *C. canephora*, divididos conforme seus SGs (I-IV), a fim de analisar as expressões de folhas e raízes. Os dados transcriptômicos foram

gerados a partir de *reads* de RNA-Seq de diferentes tecidos (raiz, estame, pistilo, folha, caule e flor) e de diferentes acessos de *C. canephora* (Tabela 1, ANEXO A), segundo o projeto de Denoeud et al. (2014).

Para esses tecidos foi feita a representação em “*heatmap*” dos valores de expressão em RPKM (“*Reads per kilo base per million mapped reads*”), o que permite comparações entre os vários genes *DREB* de cada SG e tecidos e posteriores comparações com os resultados de expressão gênica *in vivo*.

3.5 RT-qPCR

A técnica de RT-qPCR foi realizada no equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System conforme as recomendações do fornecedor (Applied Biosystems, Foster City, CA, E.U.A.). Para a detecção da amplificação foi utilizado o fluoróforo Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante.

Para cada reação de RT-qPCR foram utilizados 5 µL de SYBR[®] Green, 0,2 µL de cada par de *primer* (10 µM), 1 µL de cDNA diluído (1:10) e o restante completado para um volume final de 10 µL com água Milli-Q. A mistura da reação foi incubada por 2 minutos a 50°C (tratamento uracyl, Uracil-DNA), 5 minutos a 95°C (inativação da UDGase) seguida de 40 ciclos de amplificação de 3 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C.

Como gene de referência foi utilizado para todas as reações o gene *CcUBQ10* (CRUZ et al., 2009), que codifica para a ubiquitina (Tabela 1, APÊNDICE A) e como calibrador, a amostra 14I.

Os resultados gerados pelo *Software* 7500 (v. 2.0.6) foram analisados com base nas curvas de dissociação (“*melting curve*”) dos produtos amplificados para verificar a especificidade dos pares de *primers* por meio da presença de um único pico, que caracteriza a *Tm* (“*melting temperature*”) dos amplicons, ou

seja, a temperatura de desnaturação de 50% das moléculas. Além disso, foram analisados os valores de Cts (Ciclo *threshold*) para verificar se a eficiência da amplificação do alvo (gene de interesse) e a eficiência da amplificação da referência (gene de referência) são semelhantes.

3.5.1 Testes preliminares

Para o teste de todos os 31 pares de *primers* desenhados foi feito um *pool* de cDNA diluído (1:10) de folhas e outro *pool* de raízes de amostras separadas para cada condição (I e NI). Os pares de *primers* foram testados para cada *pool* juntamente com o gene de referência e NTC (“*no template control*”). Foram comparados os *primers* de ambos tecidos e condições e selecionados aqueles com os melhores resultados de curvas de dissociação e amplificação para as análises de expressão gênica.

3.5.2 Expressão gênica *in vivo*

Para as análises de expressão gênica de todos os *primers* selecionados foi avaliada a escala de expressão relativa, considerando como expressão diferencial aquela maior de 1x (vez).

A normalização da expressão dos genes alvo foi realizada através da quantificação comparativa pela equação $\Delta Ct = Ct(\text{gene alvo}) - Ct(\text{gene de referência})$. A calibração foi determinada pela fórmula $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{amostra}) - \Delta Ct(\text{calibrador})$ e a quantificação relativa pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os resultados foram normalizados com os Cts obtidos para o gene de referência na mesma reação e o método utilizado foi a quantificação relativa (Ct comparativo).

3.6 Eficiência dos pares de *primers*

A eficiência de amplificação de cada amostra foi feita para as folhas e raízes. A eficiência dos pares de *primers* selecionados foi calculada pelo *software* LinRegPCR (v. 2016.0.0.0) (RAMAKERS et al., 2003) e feita manualmente a média de eficiência para cada par. Para as análises de expressão gênica foi considerado o intervalo ótimo de eficiência entre 89-100%.

4 RESULTADOS

4.1 Expressões *in silico* dos genes da subfamília *DREB* de *C. canephora* nas folhas e raízes

Para todos os 31 genes da subfamília *DREB* de *C. canephora* foi analisada a expressão gênica *in silico* nas folhas e raízes através dos níveis de expressão em “*heatmap*” dos diferentes tecidos, sendo os valores de expressão normalizados em RPKM. Para as análises de expressão os genes *DREB* foram comparados conforme seus respectivos SGs (I-IV).

4.1.1 Expressões *in silico* dos genes *DREB* do subgrupo I

Todos os genes *DREB* do SG-I apresentaram perfis de expressão diferenciais entre folhas e raízes (Figura 9). Comparando os níveis de expressão dos cinco genes desse SG entre os dois tecidos, quatro deles foram mais expressos na raiz: *Cc03_g07870*, *Cc05_g06840*, *Cc07_g15390* e *Cc10_g07460*. Já a maior expressão na folha foi verificada para o gene *Cc08_g15980*.

Em níveis de expressão, o gene *Cc10_g07460* foi o mais expresso do SG-I, tanto na raiz como na folha. Além desse gene, outros dois com os maiores níveis de expressão foram *Cc07_g15390* e *Cc08_g15980*, os quais podem ter potencial participação no estresse abiótico e são importantes candidatos para serem testados *in vivo*.

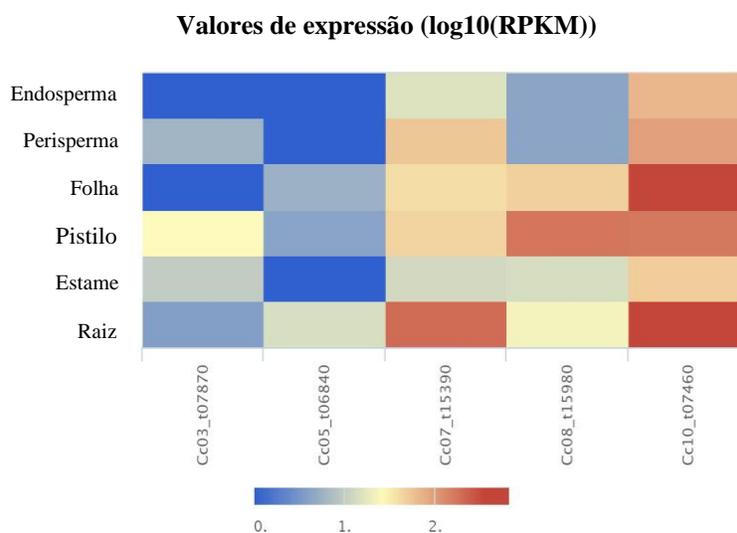


Figura 9 Representação em “*heatmap*” dos valores de expressão dos genes *DREB* (RPKM) do SG-I de *C. canephora* em diferentes tecidos (endosperma, perisperma, folha, pistilo, estame e raiz), obtidos a partir de dados de RNA-Seq de *C. canephora*. As cores mais próximas do vermelho mais intenso indicam maior expressão dos genes *DREB* conforme os tecidos analisados. Dados obtidos a partir do Banco de Dados Coffee Genome Hub (<http://coffee-genome.org/>).

4.1.2 Expressões *in silico* dos genes *DREB* do subgrupo II

Todos os genes *DREB* do SG-II apresentaram perfis de expressão em pelo menos um dos tecidos, folha e/ou raiz (Figura 10). Dos seis genes que compreendem esse SG, dois deles apresentaram maior expressão na raiz: *Cc07_g06220* e *Cc10_g04710*. Já a maior expressão na folha foi verificada para o gene *Cc06_g12520*.

Os genes *DREB* do SG-II mais expressos foram *Cc06_g12520* na folha, *Cc07_g06220* e *Cc10_g04710* nas raízes, os quais se destacam por serem potenciais GCs responsivos à seca.

Perfis de expressão semelhantes para os dois tecidos foram observados para o gene *Cc10_g10960*, não parecendo haver uma expressão diferencial entre os tecidos. Os genes *Cc08_g07780* e *Cc10_g09120* não apresentaram expressão em ambos tecidos.

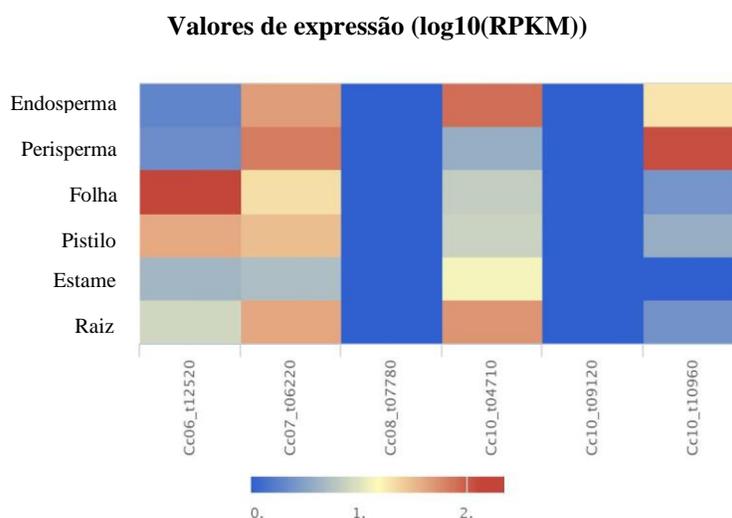


Figura 10 Representação em “heatmap” dos valores de expressão dos genes *DREB* (RPKM) do SG-II de *C. canephora* em diferentes tecidos (endosperma, perisperma, folha, pistilo, estame e raiz), obtidos a partir de dados de RNA-Seq de *C. canephora*. As cores mais próximas do vermelho mais intenso indicam maior expressão dos genes *DREB* conforme os tecidos analisados. Dados obtidos a partir do Banco de Dados Coffee Genome Hub (<http://coffee-genome.org/>).

4.1.3 Expressões *in silico* dos genes *DREB* do subgrupo III

O SG-III compreende o maior número de genes, totalizando doze (Figura 11). Desse total, quatro genes apresentaram maior expressão foliar em relação ao radicular: *Cc02_24810* e *Cc06_g10260*. Na raiz, maior expressão foi verificada para o gene *Cc04_g02760*.

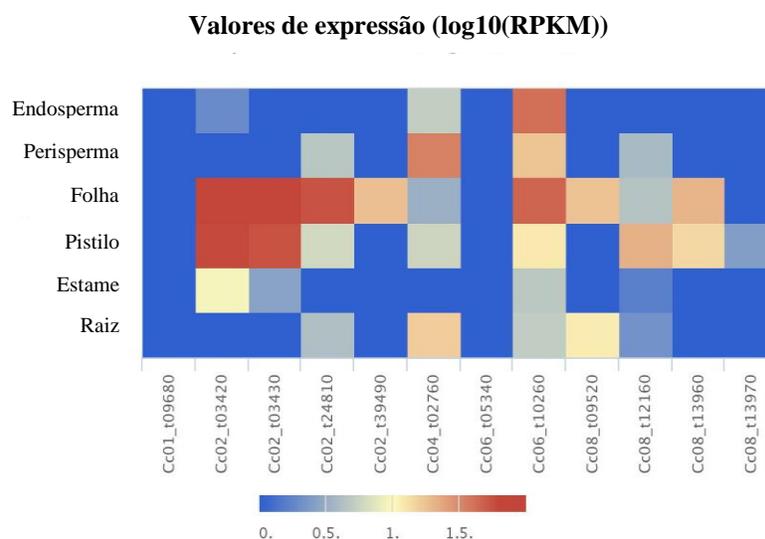


Figura 11 Representação em “heatmap” dos valores de expressão dos genes *DREB* (RPKM) do SG-III de *C. canephora* em diferentes tecidos (endosperma, perisperma, folha, pistilo, estame e raiz), obtidos a partir de dados de RNA-Seq de *C. canephora*. As cores mais próximas do vermelho mais intenso indicam maior expressão dos genes *DREB* conforme os tecidos analisados. Dados obtidos a partir do Banco de Dados Coffee Genome Hub (<http://coffee-genome.org/>).

Os genes do SG-III que apresentaram os maiores níveis de expressão foram *Cc02_g03420*, *Cc02_g03430*, *Cc02_g24810* e *Cc06_g10260*, os quais podem estar implicados nas respostas à seca, sendo necessárias validações *in vivo* para verificar seus possíveis papéis biológicos.

Níveis semelhantes de expressão foram observados em folhas e raízes para os genes *Cc08_g09520* e *Cc08_g12160*. Já os genes *Cc01_g09680*, *Cc06_g05340* e *Cc08_g13970* não apresentaram expressão em ambos tecidos.

4.1.4 Expressões *in silico* dos genes *DREB* do subgrupo IV

Os maiores níveis de expressão do SG-IV nas folhas e raízes foram para os genes *Cc10_g14150* e em especial, *Cc10_g14160* (Figura 12), o que pode indicar que esses genes possuem prováveis respostas aos estresses abióticos.

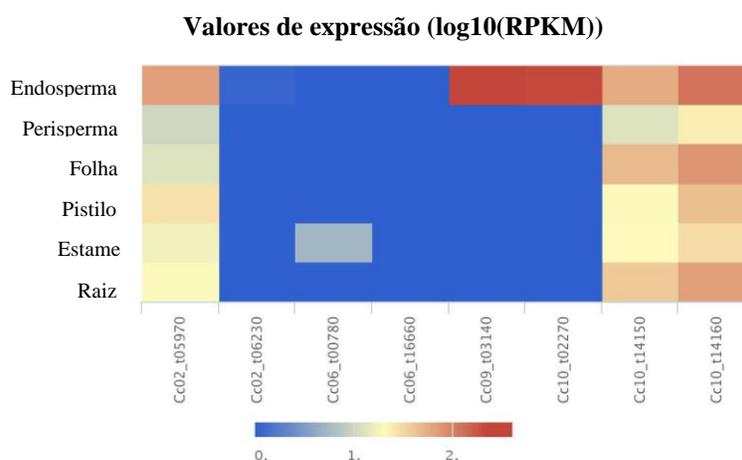


Figura 12 Representação em “*heatmap*” dos valores de expressão dos genes *DREB* (RPKM) do SG-IV de *C. canephora* em diferentes tecidos (endosperma, perisperma, folha, pistilo, estame e raiz), obtidos a partir de dados de RNA-Seq de *C. canephora*. As cores mais próximas do vermelho mais intenso indicam maior expressão dos genes *DREB* conforme os tecidos analisados. Dados obtidos a partir do Banco de Dados Coffee Genome Hub (<http://coffee-genome.org/>).

Expressões similares em ambos tecidos foram verificadas para o gene *Cc02_g05970*, enquanto que os genes *Cc02_g06230*, *Cc06_g00780*, *Cc06_g16660*, *Cc09_g03140* e *Cc10_g02270* não foram expressos nas folhas e raízes.

4.2. Expressões dos genes da subfamília *DREB* de *C. canephora* em resposta à seca nas folhas e raízes pela RT-qPCR

Mesmo com a seleção feita *in silico* dos GCs mais pertinentes de cada SG (Tabela 1, APÊNDICE A) para serem testados *in vivo*, todos os 31 pares de *primers* desenhados dos genes da subfamília *DREB* de *C. canephora* foram testados em ensaios preliminares pela RT-qPCR, a fim de ampliar ao máximo o número de genes com respostas à seca.

Pelo teste dos *primers*, foram selecionados 15 deles para as análises de expressão gênica (Tabela 1, APÊNDICE A), enquanto que os demais não amplificaram ou não foram específicos, como é possível verificar pela curva de dissociação do *primer* do gene *Cc01_g09680*, por exemplo, cujos picos não foram únicos e definidos para as duas condições (I e NI) e tecidos (folhas e raízes) (Figura 1, APÊNDICE B). Isso difere dos resultados de um *primer* selecionado, o gene *Cc07_g15390* (Figura 2, APÊNDICE B), com Tm semelhante nas duas condições e tecidos. Para testar a especificidade dos *primers* não incluídos nas análises, outros experimentos com novos pares de *primers* poderão ser necessários.

Para as análises de expressão gênica foram considerados aqueles genes e tecidos que correspondem a uma eficiência de *primers* igual ou superior a 89% (Tabela 2, APÊNDICE A) e com expressão relevante para os diferentes clones.

4.2.1 Expressões *in vivo* dos genes *DREB* do subgrupo I

Para o gene *Cc05_g06840* (Figura 13B), os clones 14 e 73 foram os mais expressos na folha em condição de seca e apresentaram um aumento na expressão nessas condições em aproximadamente 17 e 29x, respectivamente, em relação ao clone sensível.

Maiores níveis de expressão foram observados para o gene *Cc08_g15980* (Figura 13E) nos clones 14 e 73 NI em aproximadamente 2,8x e 2,6x em relação ao clone sensível nas folhas. Na raiz (Figura 13F), os clones submetidos ao déficit hídrico apresentaram maiores níveis de expressão em relação aos clones na condição irrigada, com destaque ao clone 73. Comparando-se os níveis de expressão, a raiz apresentou os maiores níveis quando comparada com a folha.

Em termos de respostas à seca, os genes mais pertinentes do SG-I foram *Cc08_g1590* e principalmente, *Cc05_g06840*, pelos maiores níveis de expressão. Para esses dois genes, os clones 14 e 73 NI foram os mais responsivos à seca.

O gene *Cc03_g07870* (Figura 13A) apresentou maior expressão em resposta à seca em todos os clones na folha, entretanto, o clone sensível foi mais expresso do que os tolerantes (73 e 120).

Para o gene *Cc07_g15390* não foi observado um perfil de expressão diferencial entre os clones I e NI da folha (Figura 13C) e raiz (Figura 13D), mas este último tecido apresentou um leve aumento na expressão dos clones tolerantes submetidos à seca.

Do SG-I, apenas o gene *Cc10_g07460* não foi analisado quanto a sua expressão gênica. Esse gene foi o que apresentou a maior expressão *in silico* na folha e raiz e também em outros tecidos (endosperma, perisperma, pistilo e estame) (Figura 9). Assim, para confirmar se esse gene possui ou não resposta à seca, seria necessário desenhar outro par de *primer* para esse gene.

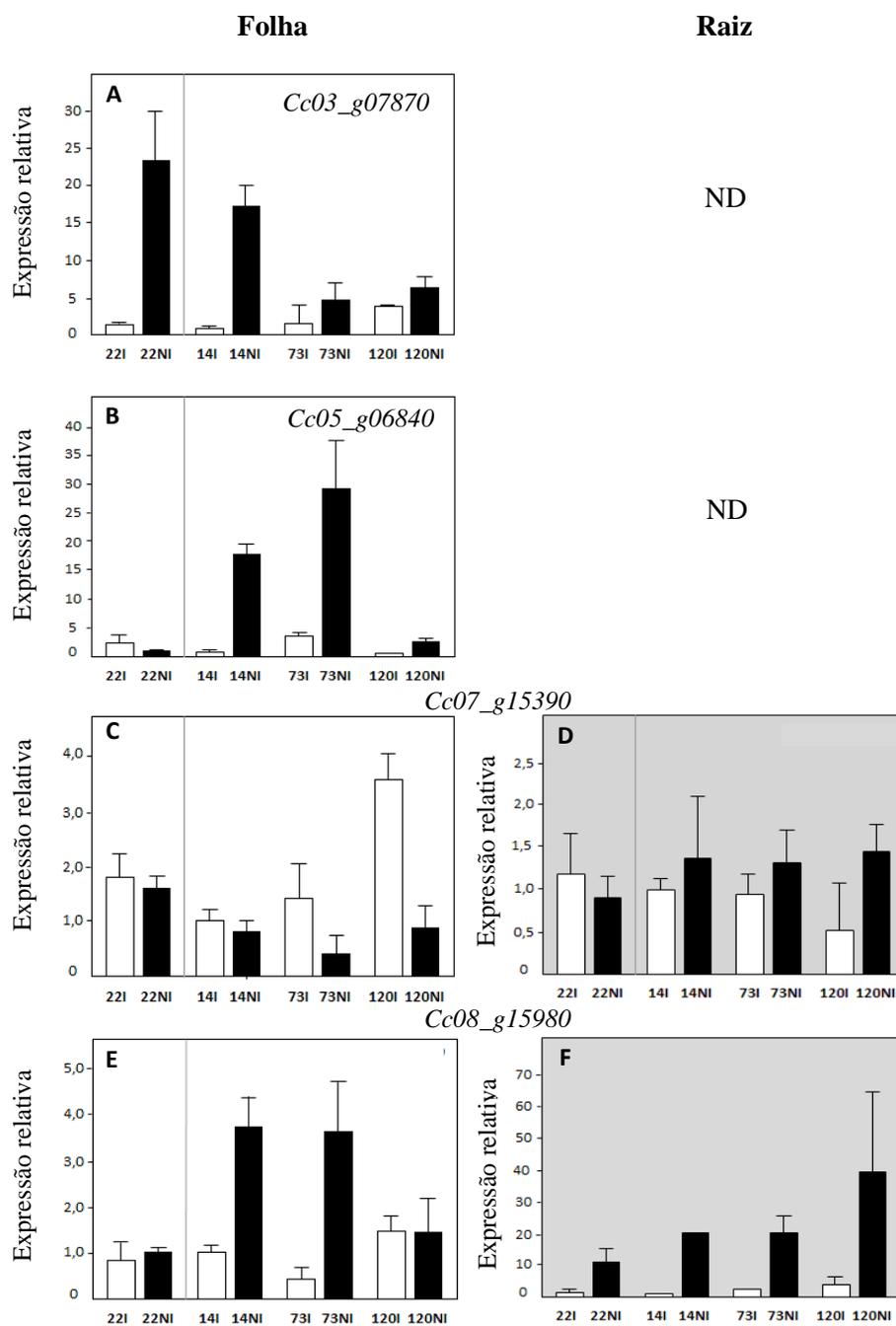


Figura 13 Perfis de expressão dos genes *DREB* do SG-I de *C. canephora* em folhas (à esquerda, em fundo branco) e raízes (à direita, em fundo cinza) dos clones tolerantes (14, 73 e 120) e sensível (22) de Conilon submetidos (NI) à seca, obtidos pela técnica de RT-qPCR. O gene *CcUBQ10* foi utilizado como gene de referência e 14I como amostra de referência. Genes *DREB*: A= *Cc03_g07870*, B= *Cc05_g06840*, C/D= *Cc07_g15390*, E/F= *Cc08_g15980*. ND: resultado não obtido.

4.2.2 Expressões *in vivo* dos genes *DREB* do subgrupo II

O gene *Cc10_g04710* na folha (Figura 14B) apresentou um aumento na expressão em resposta à seca em todos os clones, com níveis de expressão semelhantes para todos eles. Já para a raiz (Figura 14C) somente o clone 14 apresentou maior expressão em resposta à seca, em aproximadamente 1,5x em relação a condição irrigada. Esse gene é considerado o mais pertinente em resposta à seca do SG-II, devido sua maior expressão em relação aos demais genes desse SG.

Para o gene *Cc07_g06220* na folha (Figura 14A) não foi observada maior expressão na condição de seca quando comparada a condição irrigada.

Os genes *Cc10_g09120* e *Cc10_g10960* apresentaram níveis de expressão muito baixos nos diferentes clones e tecidos em resposta à seca. Pelas análises de expressão gênica *in silico*, esses genes apresentaram também baixos níveis de expressão nas folhas e raízes e nos demais tecidos (endosperma, perisperma, pistilo e estame) (Figura 10), mostrando que aparentemente não são responsivos aos estresses abióticos.

Os genes *Cc06_g12520* e *Cc08_g07780* não analisados quanto a sua expressão pela RT-qPCR apresentaram diferentes perfis de expressão *in silico*. O gene *Cc08_g07780* apresentou os mais baixos níveis de expressão em todos os tecidos, assim como *Cc10_g09120*, cujas explicações podem ser as mesmas.

Já o gene *Cc06_g12520* mostrou alto nível de expressão *in silico* na folha e com base nessa informação, desenhar outro par de *primer* para esse gene é relevante para confirmar ou não a sua participação na resposta à seca.

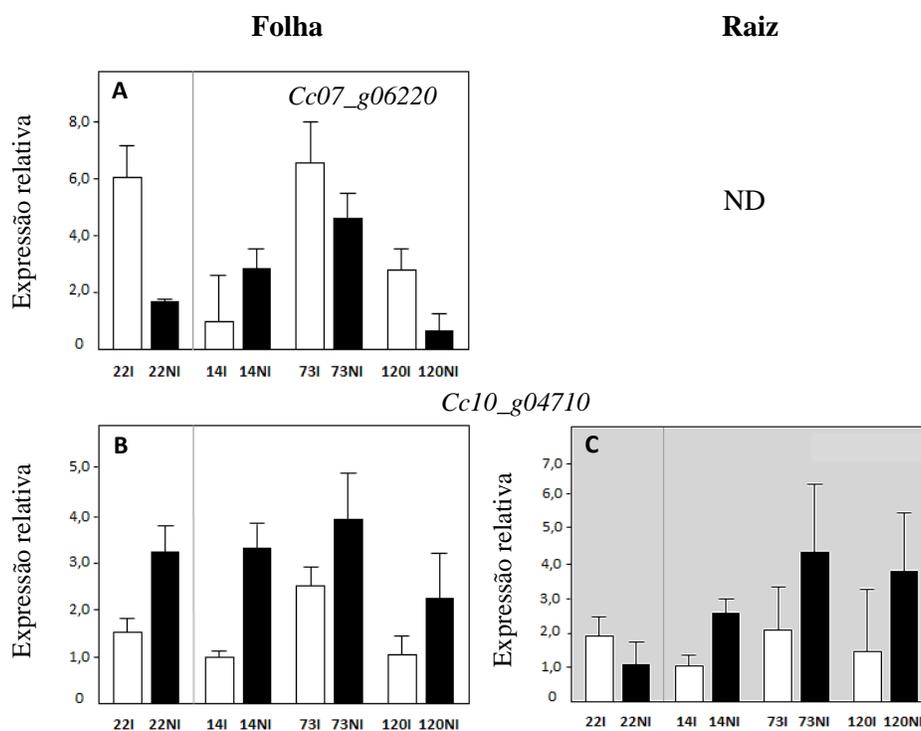


Figura 14 Perfis de expressão dos genes *DREB* do SG-II de *C. canephora* em folhas (à esquerda, em fundo branco) e raízes (à direita, em fundo cinza) dos clones tolerantes (14, 73 e 120) e sensível (22) de Conilon submetidos (NI: não irrigado, colunas em preto) ou não (I: irrigado, colunas em branco) à seca, obtidos pela técnica de RT-qPCR. O gene *CcUBQ10* foi utilizado como gene de referência e 14I como amostra de referência. Genes *DREB*: A= *Cc07_g06220*, B/C= *Cc10_g04710*. ND: resultado não obtido.

4.2.3 Expressões *in vivo* dos genes *DREB* do subgrupo III

Para o gene *Cc08_13960*, maiores níveis de expressão em resposta à seca foram observados na folha (Figura 15D), de modo que os clones tolerantes foram mais expressos em relação ao sensível. Entre os clones tolerantes, destaca-se o 73 em condição de seca, sendo mais expresso em cerca de 94x quando comparado com o clone sensível.

O gene *Cc08_g13970* apresentou maior expressão nas folhas em resposta à seca nos clones 73 e 120 em condição de seca (Figura 15E).

Os genes do SG-III considerados com grande potencial para a resposta à seca são *Cc08_g13970* e em especial, *Cc08_g13960*, pelos maiores níveis de expressão, de modo que o clone 73 foi o mais expresso na condição de seca.

O gene *Cc02_g03420* na raiz (Figura 15A) não apresentou expressão diferencial entre os diferentes clones em resposta à seca em relação a condição I e/ou não houve maior expressão na condição NI.

Para o gene *Cc02_g24810* foi observada uma queda de expressão em todos os clones não irrigados nas folhas (Figura 15B) e raízes (Figura 15C), com maior queda na expressão da folha. Esses resultados podem indicar que os genes *Cc02_g03420* e *Cc02_g24810* podem não ser responsivos à seca.

Para os genes do SG-III não analisados quanto à sua expressão pela RT-qPCR o ideal seria redesenhar outros pares de *primers* para aqueles genes que apresentaram altos níveis de expressão *in silico* nas folhas e raízes. Esse é o caso dos genes *Cc02_g03430* e *Cc06_g10260* com alta expressão na folha; *Cc02_g39490* e *Cc08_g09520* com expressões moderadas nas folhas e *Cc04_g02760* com expressão moderada na raiz.

Já os genes *Cc01_g09680* e *Cc06_g05340* não apresentaram expressão *in silico* nas folhas e raízes e nos outros tecidos (endosperma, perisperma, pistilo e estame) (Figura 11), o que pode indicar que esses genes não estão potencialmente envolvidos na resposta aos estresses abióticos.

O gene *Cc08_g12160* também apresentou baixos níveis de expressão na folha e raiz, mas apresenta uma expressão mais acentuada em outro tecido, pistilo (Figura 11), o que pode explicar o fato desse gene não ter tido seu *primer* analisado, já que os tecidos avaliados (folha e raiz) *in vivo* eram quase inexpressivos para esse gene.

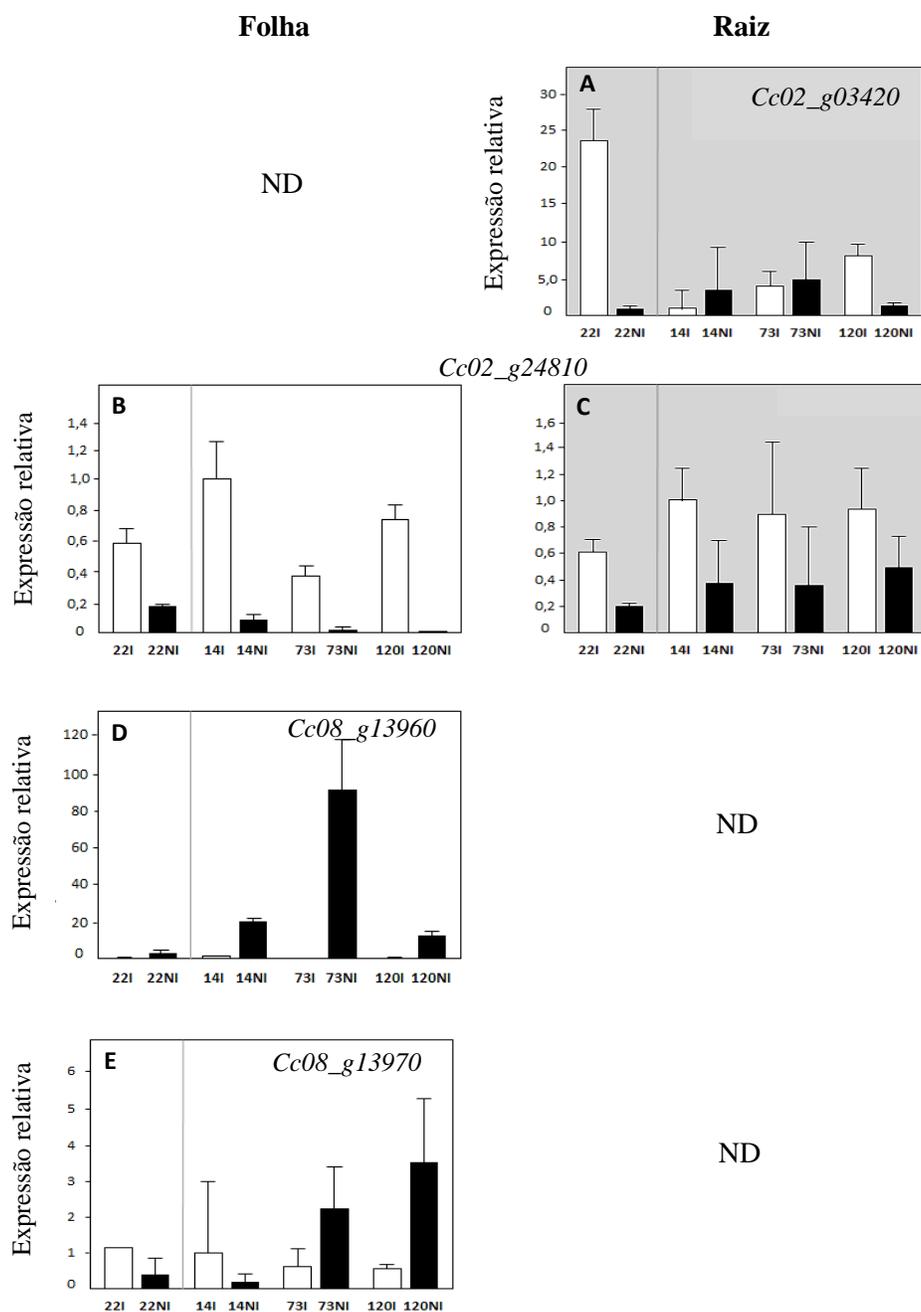


Figura 15 Perfis de expressão dos genes *DREB* do SG-III de *C. canephora* em folhas (à esquerda, em fundo branco) e raízes (à direita, em fundo cinza) dos clones tolerantes (14, 73 e 120) e sensível (22) de Conilon submetidos (NI: não irrigado, colunas em preto) ou não (I: irrigado, colunas em branco) à seca, obtidos pela técnica de RT-qPCR. O gene *CcUBQ10* foi utilizado como gene de referência e 14I como amostra de referência. Genes *DREB*: A= *Cc02_g03420*, B/C= *Cc02_g024810*, D = *Cc08_g13960*, E= *Cc08_g13970*. ND: resultado não obtido.

4.2.4 Expressões *in vivo* dos genes *DREB* do subgrupo IV

Para o gene *Cc10_g14160* não houve uma expressão diferencial entre as condições I e NI nas folhas (Figura 15A). Apenas o clone 14 se mostrou um pouco mais expresso em relação a condição irrigada e também ao clone sensível. Já a raiz (Figura 16B), apresentou maior nível de expressão quando comparado com a folha e somente o clone 14 apresentou maior expressão em resposta à seca. Esse gene mostrou ser o melhor candidato do SG-IV em resposta à seca.

Os genes *Cc06_g00780* e *Cc10_g02270* apresentaram níveis de expressão muito e/ou não se expressaram *in vivo* em resposta à seca. Do mesmo modo, observou-se que pela expressão *in silico*, os dois genes não se expressaram nas folhas e raízes e nem nos outros tecidos (endosperma, perisperma, pistilo e estame), exceto o gene *Cc10_g02270*, que mostrou ser tecido-específico com alta expressão somente no endosperma. Com base nisso, esses dois genes não aparentam ser responsivos à seca.

Os genes não analisados pela RT-qPCR, *Cc02_g05970* mostrou níveis moderados de expressão *in silico* nas raízes, e *Cc10_14150* moderadamente altos nas folhas e raízes. Para ambos os genes, em especial esse último, outros pares de *primers* poderão ser desenhados para verificar se o SG-IV pode apresentar mais membros com resposta à seca.

Já os genes *Cc02_06230*, *Cc06_g16660* e *Cc09_g03140* não apresentaram expressão *in silico* nos tecidos analisados (endosperma, perisperma, folha, pistilo, estame e raiz) (Figura 12), exceto o gene *Cc09_g03140*, que mostrou ser tecido-específico para o endosperma. Assim, esses genes podem não ter resposta à seca ou podem ser expressivos em outros tecidos.

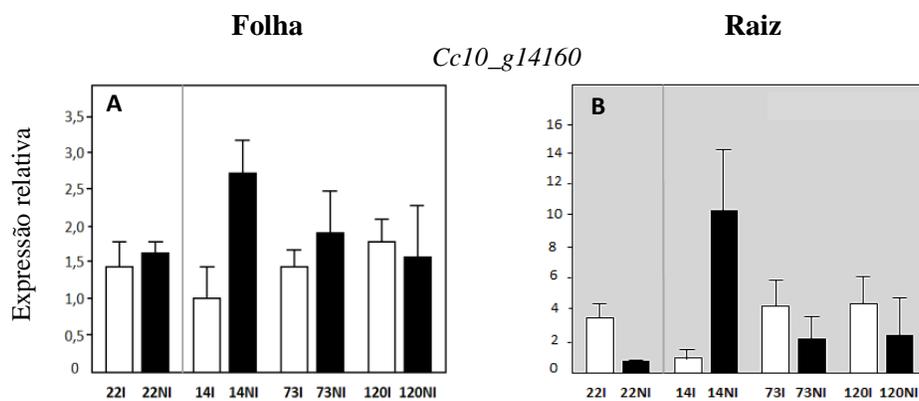


Figura 16 Perfis de expressão dos genes *DREB* do SG-IV de *C. canephora* em folhas (à esquerda, em fundo branco) e raízes (à direita, em fundo cinza) dos clones tolerantes (14, 73 e 120) e sensível (22) de Conilon submetidos (NI: não irrigado, colunas em preto) ou não (I: irrigado, colunas em branco) à seca, obtidos pela técnica de RT-qPCR. O gene *CcUBQ10* foi utilizado como gene de referência e 14I como amostra de referência. Genes *DREB*: A/B=*Cc10_g14160*.

5 DISCUSSÃO

Pela expressão *in silico* dos genes *DREB* de *C. canephora*, baseada nos dados de RNA-Seq de *C. canephora* disponíveis no Coffee Genome Hub, e a expressão *in vivo* pela RT-qPCR, foi possível selecionar GCs de diferentes SGs (I-IV) (Tabela 1, APÊNDICE A) que apresentaram respostas diferenciais mais relevantes nas folhas e raízes e em resposta à seca (condição NI) nos clones tolerantes e sensível de Conilon. As duas abordagens, *in silico* e *in vivo*, serão comparadas em relação aos resultados de expressão dos genes *DREB* mais pertinentes. Posteriormente, os GCs validados *in vivo* serão comentados quanto a sua expressão em resposta à seca para os SGs I e II, os mais relatados na literatura e III-IV, os SGs com os maiores números de membros. As respostas desses genes serão também comparadas em relação aos clones e tecidos mais expressos.

5.1 Comparações das expressões *in silico* e *in vivo* dos genes *DREB*

Os GCs *DREB* previamente indicados *in silico*, *Cc08_g15980* do SG-I, *Cc10_g04710* do SG-II e *Cc10_g14160* do SG-IV se mostraram também GCs pertinentes *in vivo*. Isso demonstra que as análises *in silico* podem auxiliar na identificação de genes potencialmente envolvidos nas respostas aos estresses abióticos, como a seca, em *C. canephora*, para suas posteriores validações *in vivo*.

A fim de ampliar ao máximo o número de genes responsivos à seca, testar outros genes *in vivo* além dos somente indicados como GCs pela expressão *in silico* permitiu caracterizar outros genes com potenciais respostas à seca, como os genes *Cc05_g06840* do SG-I, *Cc08_13960* e *Cc08_g13970* do SG-III.

As análises *in silico* também forneceram indícios de expressões dos genes *DREB* em outros tecidos além das folhas e raízes, como endosperma, perisperma, pistilo e estame. Essas informações extras podem explicar o motivo de muitos genes dos SG-III e -IV, por exemplo, não terem se expressado em resposta à seca quando avaliados somente as folhas e raízes, uma vez que podem ter sido mais expressos em outros tecidos. Isso foi observado para os genes *Cc04_g02760* e *Cc06_g10260*, que mostraram alta expressão no perisperma e endosperma, respectivamente (Figura 11). Já os genes *Cc09_g03140* e *Cc10_g02270* mostraram ser tecido-específicos, uma vez que houve expressão somente no endosperma (Figura 12).

Pela análise *in silico*, não foi observada uma expressão diferencial para os genes pouco expressos: *Cc08_g07780*, *Cc10_g09120*, *Cc10_g10960* do SG-II, *Cc02_g39490* do SG-III e *Cc06_g00780*, *Cc06_g16660* do SG-IV. Baixos níveis de expressões somente na raiz foram verificados para os genes *Cc01_g09680* do SG-III e *Cc02_g06230*, *Cc10_g02270* do SG-IV, enquanto que para os genes *Cc06_g05340* do SG-III e *Cc09_g03140* do SG-IV não houve expressão nas folhas e raízes. Todos esses genes não foram selecionados pelo teste de *primers* ou quando foram selecionados, não apresentaram resultados de expressão gênica *in vivo* relevantes (Tabela 1, APÊNDICE A), o que concorda com os resultados previamente relatados pelas análises *in silico*.

5.2 Análises das expressões *in vivo* dos GCs *DREB* dos subgrupos I e II em resposta à seca

O SG-I compreende cinco genes, dos quais quatro deles (*Cc03_g07870*, *Cc05_g06840*, *Cc07_g15390* e *Cc08_g15980*) apresentaram perfis de expressão em resposta à seca, o que indica que esse SG apresenta o maior número de genes *DREB* expressos nessa condição. Em termos de maiores níveis de expressão em

resposta à seca, *Cc05_g06840* e *Cc08_g15980* são considerados os GCs do SG-I.

Apesar dos genes *DREB1* serem geralmente induzidos pela baixa temperatura, existem divergências em relação a essas características (ZHOU et al., 2010), como foi verificado neste trabalho. Outros trabalhos também relataram a expressão em resposta à seca, como o de Marraccini et al. (2012), em que o déficit hídrico aumentou a expressão de *CcDREB1D* de *C. canephora* nas folhas; a super expressão de *CBF1/DREB1B* de *Arabidopsis* no tomate pode aumentar a tolerância ao déficit hídrico (HSIEH et al., 2002) e a super expressão de *OsDREB1F* de arroz aumenta a tolerância à seca em *Arabidopsis* e arroz (WANG et al., 2008).

Do SG-II, destaca-se o gene *Cc10_g04710* como GC em resposta à seca. Essa resposta é também característica das proteínas DREB2, que são ativadas pela seca ou alta salinidade (LUCAS et al., 2011). Para esse SG, foi observado que o déficit hídrico aumentou significativamente a expressão do gene *HvDREB1* (*Hordeum vulgare*) nas folhas de cevada (XU et al., 2009).

Os SG-I e -II dos genes *DREB* codificam fatores de transcrição (KIZIS; PAGES, 2002; XU et al., 2010). Assim, baseado nos resultados de expressão de resposta à seca apresentados neste trabalho, os GCs desses subgrupos podem desempenhar papel importante nos mecanismos de tolerância à seca em *C. canephora*.

5.3 Análises das expressões *in vivo* dos GCs *DREB* dos subgrupos III e IV em resposta à seca

Os genes do SG-III que apresentaram maiores níveis de expressão em resposta à seca foram *Cc08_13960*, *Cc08_g13970* e do SG-IV, o gene *Cc10_g14160*.

Diferentemente desses GCs, a maioria dos doze genes do SG-III e dos oito genes do SG-IV não apresentaram resposta à seca. Uma possível explicação para tantos genes desses dois SGs não terem se expressado é de que as expressões nas folhas desses genes podem ter sido transitórias durante a queda do potencial hídrico. Como as coletas de folhas foram feitas somente no final do período de 2 semanas em que as plantas de Conilon estavam submetidas ou não ao déficit hídrico, o ideal seria fazer outras coletas ao longo desse período para avaliar a cinética da queda do potencial hídrico e confirmar as expressões desses genes.

Outra hipótese para os SG-III e -IV terem poucos genes responsivos à seca pode ser pelo fato de não terem sido ativados pelo déficit hídrico aplicado nas plantas de Conilon. Esses genes podem ter sido induzidos por outros estresses abióticos, já que os genes *DREB* pertencem a uma família envolvida nas respostas a diversos estresses abióticos além da seca, como a alta salinidade e a baixa temperatura, por exemplo. Assim, os membros dos diferentes SGs de *DREB* podem desempenhar múltiplos papéis nas plantas (ZHOU et al., 2012).

De modo geral, as diferenças funcionais observadas entre os membros dos SGs-I a IV podem ser devido aos vários genes alvo que estão presentes no genoma, as suas distintas respostas e a capacidade do FT ativar ou reprimir cada gene alvo (HUSSAIN et al., 2011).

5.4 Análise dos GCs *DREB* mais expressos nos clones tolerantes em resposta à seca

Os genes GCs do SG-I (*Cc05_g06840*, *Cc08_g15980*), do SG-II (*Cc10_g04710*), do SG-III (*Cc08_g13960*, *Cc08_13970*) e do SG-IV (*Cc10_g14160*) apresentaram maior expressão nos clones tolerantes quando comparados com o sensível. Esses níveis de expressão diferencial em resposta à

seca entre os clones de *C. canephora* sugerem uma via de sinalização de ABA mais ativa nos clones tolerantes (14, 73 e 120) do que no clone sensível (22) (VIEIRA et al., 2013).

Entre os clones tolerantes, observou-se que os clones 14 e 73 foram os mais expressos na folha em condição de seca para a maioria dos genes: *Cc05_g06840*, *Cc08_g15980* (SG-I), *Cc08_g13960* (SG-III) e *Cc10_g14160* (SG-IV). Dentre esses, *Cc05_g06840* e *Cc08_g13960* foram os genes que apresentaram maior expressão no clone 73 em resposta à seca, o que pode ser devido a sua maior eficiência em controlar o fechamento estomático e a transpiração em relação aos clones 14 e 120 (VIEIRA et al. 2013).

Para as raízes também foi verificada maior expressão de clone tolerante (14) em relação ao sensível em resposta à seca nos genes *Cc10_g04710* (SG-II) e *Cc10_g14160* (SG-IV). Neste último gene, o clone 14 com déficit hídrico se destacou pela alta expressão em relação aos outros tolerantes, podendo existir uma ativação particular específica nesse clone.

Diferentes vias regulatórias na transcrição podem estar envolvidas na expressão do gene responsivo ao estresse (CHEN et al., 2007): as vias dependentes e independentes de ABA. Nessas vias podem existir “*crosstalks*” entre elas, ou seja, interações entre as vias de respostas, tanto para os estresses abióticos como os bióticos. Esses “*crosstalks*” podem explicar o fato do clone 14 na raiz apresentar tolerância à seca e resistência múltipla a diversas espécies de *Meloidogyne*, as quais infectam as raízes de cafeeiros (COSTA et al., 2016).

Para os DREB, existe uma conexão entre a tolerância à seca e a resistência à doença, e o controle da expressão de genes responsivos a esses estresses abióticos e bióticos é pela via independente de ABA (AGARWAL et al., 2006).

As diferenças de respostas à seca entre os clones podem estar relacionadas, de um modo geral, com as diferentes especializações que cada um

dos genes *DREB* podem apresentar. Dessa forma, os genes *DREB* podem responder de formas diferentes e em diferentes plantas, mesmo que essas tenham sido submetidas ao mesmo estresse de igual intensidade.

5.5 Análise dos GCs *DREB* mais expressos em folhas em resposta à seca

Comparando-se as expressões de folhas e raízes em resposta à seca, observou-se que as folhas apresentaram maiores níveis de expressão e maior número de GCs expressos: *Cc05_g06840*, *Cc08_g15980* do SG-I e *Cc08_g13960*, *Cc08_g13970* do SG-III. Respostas transcriptômicas diferentes entre folha e raiz também foram verificadas em dois genótipos híbridos de álamo que exibem tolerância contrastante à seca (COHEN et al., 2010).

Os padrões distintos observados entre folhas e raízes podem ser devido as diferentes vias regulatórias, as dependentes e independentes de ABA. Este fitohormônio possui importante papel nas respostas ao estresse abiótico, como a regulação do fechamento estomático, que visa otimizar a transpiração e desencadear a ativação de muitos genes relacionados ao estresse (CUTLER et al., 2010).

5.6 Considerações finais e perspectivas

Para os genes *DREB*, principalmente aqueles indicados com alta expressão *in silico* e que não tiveram seus produtos amplificados pela RT-qPCR (Tabela 1, APÊNDICE A), como por exemplo, os genes *Cc10_g07460* (SG-I), *Cc06_g12520* (SG-II), *Cc02_g03430*, *Cc04_g02760*, *Cc06_g10260* (SG-III) e *Cc10_g14150* (SG-IV), sugere-se desenhar outros pares de *primers* para confirmar se esses genes podem estar envolvidos nas respostas à seca. Em especial, para o gene *Cc02_g03430*, caracterizado por Alves (2015) como

CcDREB1D, que apresentou expressão diferencial em resposta à seca na folha (Figura 6) e já foi feita a caracterização funcional do promotor desse gene em plantas transgênicas de *C. arabica* (ALVES et al., 2014) e *Nicotiana tabacum* (AQUINO et al., 2015).

As análises de expressão gênica *in vivo* permitiram a identificação de possíveis genes *DREB* de diferentes SGs de *C. canephora* que podem participar nos mecanismos regulatórios de resposta à seca. Entre os GCs, os que mais se destacaram foram *Cc05_g06840* (SG-I) e *Cc08_g13960* (SG-III) pela alta expressão em resposta à seca nos clones 14 e 73 de folha e no clone 14 da raiz (*Cc05_g06840*).

Como *C. canephora* é uma planta de grande importância socioeconômica e seu crescimento e rendimento podem ser afetados de forma acentuada pelo déficit hídrico, o conhecimento adquirido neste trabalho sobre os genes *DREB* na resposta à seca dessa espécie poderá contribuir para futuras análises que visam aumentar a sua produção de forma sustentável. Essas análises podem incluir as de diversidade genética pela busca de SNPs (“*single nucleotide polymorphisms*”) ou INDELs (“*insertion/ deletions*”) nas regiões promotoras dos genes *DREB*, como já foi iniciado por Alves (2015) para o gene *CcDREB1D*. Esses estudos poderão explicar os perfis de expressão diferenciais entre os genes dos clones tolerantes e sensível de *C. canephora* Conilon.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível identificar e caracterizar pela primeira vez diversos genes *DREB* de diferentes SGs (I-IV) de *C. canephora* nas folhas e raízes de clones tolerantes e sensível à seca.

As análises de expressão *in silico* de todos os genes *DREB* de diferentes SGs de *C. canephora* permitiram identificar genes mais expressos nas folhas e raízes, como *Cc08_g15980*, *Cc10_g04710* e *Cc10_g14160*. Esses e outros genes *DREB* foram validados pela RT-qPCR em folhas e raízes de clones tolerantes (14, 73 e 120) e sensíveis (22) de *C. canephora* Conilon submetidos ou não ao déficit hídrico, sendo indicados possíveis GCs em resposta à seca. Nesses GCs indicados *in vivo* observou-se que alguns foram também previamente indicados *in silico*.

Além disso, muitos daqueles genes que apresentaram níveis muito baixos de expressão ou não apresentaram expressão gênica *in silico*, não foram selecionados para as análises *in vivo* ou também não apresentaram resultados de expressão relevantes. Assim, as análises *in silico* podem fornecer subsídios na escolha dos genes para a sua validação *in vivo*.

Entre os quatro subgrupos da família *DREB*, o SG-I foi o que apresentou o maior número de genes expressos em resposta à seca, com expressão diferencial e maiores níveis de expressão, destacando-se os genes *Cc05_g06840* e *Cc08_g15980*. Para os GCs como esses dois genes e outros como, *Cc08_g13960*, verificou-se que os clones tolerantes foram mais expressos em relação ao sensível em resposta à seca, especialmente os clones 14 e 73 em condição de seca. Comparando-se as expressões de folhas e raízes em resposta à seca, as folhas apresentaram o maior número de genes expressos e também em maior nível de expressão para esses mesmos GCs citados previamente.

De todos os GCs *DREB* identificados *in vivo*, destacam-se os genes *Cc05_g06840* e *Cc08_g13960*, os quais podem estar implicados nos mecanismos regulatórios de respostas à seca em *C. canephora* Conilon.

Para os demais genes que não foram testados *in vivo* e/ou que não foram funcionais, sugere-se desenhar outros pares de *primers* de genes *DREB* a fim de obter resultados para os genes faltantes. Além disso, sugere-se também desenhar outros pares para os mesmos genes que foram funcionais, especialmente aqueles mais relevantes em resposta à seca (alta expressão e/ou expressão diferencial entre os clones tolerantes e sensível), para confirmar os resultados preliminares obtidos neste trabalho.

Esses conhecimentos podem fornecer subsídios para a compreensão do determinismo genético da tolerância à seca em *C. canephora*, cujo objetivo final é aumentar a sua produção, qualidade e sustentabilidade através de programas de melhoramento genético em cafeeiro.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, P. K. et al. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Plant Cell Reports**, v. 25, n. 12, p.1263-1274, 2006.

AGARWAL, P. K.; JHA, B. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signaling. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 2, p. 201-212, 2010.

AKHTAR, M. et al. DREB1/CBF transcription factors: their structure, function and role in abiotic stress tolerance in plants. **Journal of Genetics**, v. 91, n. 3, 2012.

ALEKCEVETCH, J. C. **Estudo da diversidade genética, por meio de marcadores moleculares, de uma população de *Coffea canephora* var. Conilon**. 2013. 92 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

ALVES, G. S. C. et al. **Analysis of *CcDREB1D* promoter region from drought-tolerant and susceptible clones of *Coffea canephora* by homologous genetic transformation of *Coffea arabica***. In: 11th Solanaceae Conference (Resumo), Porto Seguro, p. 167, 2014.

ALVES, G. S. C. **Characterization of a candidate gene for drought tolerance in *Coffea*: the *CcDREB1D* gene, in contrasting genotypes of *Coffea canephora* and related species**. 2015. 209 p. Tese (Doutorado em Biologia Integrativa) - AGAP/ Universidade Federal de Lavras, 2015.

ANTHONY, F. et al. The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, n. 5, p. 894-900, 2002.

AQUINO, S. O. et al. **Análise de promotores do gene *CcDREB1D* de *Coffea canephora* via transformação genética de *Nicotiana tabacum***. In: IX Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil (Resumo Expandido), Curitiba, 2015.

ASADA, K. The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 601-639, 1999.

ASHRAF, M. Inducing drought tolerance in plants: Recent advances. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 1, p. 169-183, 2010.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, p. 23-58, 2005.

BUNN, C. et al. A bitter cup: climate change profile of global production of Arabica and Robusta coffee. **Climatic Change**, v. 129, p. 89-101, 2015.

CAMARGO, A. P. Florescimento e frutificação de café arábica nas diferentes regiões cafeeiras do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 20, n.7, p. 831-839, 1985.

CHAITANYA, K. V. et al. Water stress effects on photosynthesis in different mulberry cultivars. **Plant Growth Regulation**, v. 40, p. 75-80, 2003.

CHEN, M. et al. *GmDREB2*, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 353, p. 299-305, 2007.

COHEN, D. et al. Comparative transcriptomics of drought responses in *Populus*: a meta-analysis of genome-wide expression profiling in mature leaves and root apices across two genotypes. **BMC Genomics**, v. 11, n. 630, 2010.

COSTA, T. S. **Análise do perfil transcriptômico e proteômico de raízes de diferentes clones de *Coffea canephora* em condições de déficit hídrico.** 2014. 235 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

COSTA, T. S. et al. **Analysis of drought-stress responses in roots of different clones of *Coffea canephora* by integrating transcriptomic and proteomic approaches.** A ser submetido, 2016.

COSTE, R. Coffee: the Plant and the Product. **MacMillan Press Ltd.**, 1992. 328 p.

CRUZ, F. et al. Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. **Molecular Breeding**, v. 23, p. 607-616, 2009.

CUTLER, S. R. et al. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 651-679, 2010.

DAMATTA, F. M. et al. Drought tolerance of two field-grown clones of *Coffea canephora*. **Plant Science**, v. 164, p. 111-117, 2003.

_____. Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 4, 2007.

DAMATTA, F. M. Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, n. 1, p. 1-6, 2004.

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**, v. 18, n. 1, p. 55-81, 2006.

DAVIS, A. P. et al. Growing coffee: *Psilanthus* (*Rubiaceae*) subsumed on the basis of molecular and morphological data: implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 167, p. 357-377, 2011.

_____. The impact of climate change on indigenous Arabica Coffee (*Coffea arabica*): predicting future trends and identifying priorities. **PLoS One**, v. 7, n. 11, 2012.

DENOEUDE, F. et al. The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. **Science**, v. 345, n. 6201, 2014.

DEREEPER, A. et al. The coffee genome hub: a resource for coffee genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 43, 2015.

FASSIO, L. H.; SILVA, A. E. S. **Importância econômica e social do café Conilon**. In: FERRÃO, R. G., et al. *Café Conilon*. 1. ed, Incaper, 2007.

FERRÃO, M. A. G et al. **Técnicas moleculares e biotecnológicas aplicadas ao café**. In: FERRÃO, R. G., et al. *Café Conilon*. 1. ed, Incaper, 2007.

FERRÃO, R. G. et al. EMCAPA 8141 - Robustão Capixaba, variedade clonal de café conilon tolerante à seca, desenvolvida para o estado do Espírito Santo. **Revista Ceres**, v. 47, p. 555–559, 2000.

_____. **Robustão Capixaba: variedade clonal de café Conilon tolerante à seca**. Comunicado Técnico, v. 98, 1999. 10 p.

FONSECA, A. F. A. et al. Conilon Vitória - Incaper 8142: improved *Coffea canephora* var. Kouillou clone cultivar for the State Espírito Santo. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 503-505, 2004.

_____. Manejo da cultura do café Conilon: espaçamento, densidade de plantio e podas. In: FERRÃO, R.G. et al. **Café conilon**. Incaper, cap. 9, p. 257-277, 2007.

FRANCO, C. M. Influence of temperature on growth of coffee plant. **IBEC Research Institute**, 1958. 23 p.

HSIEH, T. H. et al. Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis CBF1* show enhanced resistance to water deficit stress. **Plant Physiology**, v. 130, n. 2, p. 618-626, 2002.

HUSSAIN, S. S. et al. Transcription factors as tools to engineer enhanced drought stress tolerance in plants. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 2, p. 297-306, 2011.

KELLER, F.; LUDLOW, M. M. Carbohydrate metabolism in drought stressed leaves of pigeonpea (*Cajanus cajan*). **Journal of Experimental Botany**, v. 44, p. 1351-1359, 1993.

KHAN, M. S. The Role of DREB transcription factors in abiotic stress tolerance of plants. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 25, p. 2433-2442, 2011.

KIZIS, D.; PAGES, M. Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in *rab17* regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. **The Plant Journal**, v. 30, p. 679-689, 2002.

KUROMORI, T. et al. **Drought Stress Signaling Network**. In: HOWELL, S. H. Molecular Biology, Springer Reference, The Plant Sciences, 2014.

LASHERMES, P. et al. Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular and General Genetics**, v. 261, n. 2, p. 259-266, 1999.

LATA, C.; PRASAD, M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 14, p. 4731-4748, 2011.

LAWLOR, D. W. The effects of water deficit on photosynthesis, In: SMIRNOFF, N. Environment and plant metabolism-flexibility and acclimation. **Bios Scientific Publisher**, p. 12-160, 1995.

LEROY, T. et al. Developing core collections to optimize the management and the exploitation of diversity of the coffee *Coffea canephora*. **Genetica**, v. 142, p. 185-199, 2014.

LIMA, A. L. S. et al. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 47, p. 239-247, 2002.

LIU, L. et al. Molecular cloning, expression profiling and trans-activation property studies of a DREB2-like gene from chrysanthemum (*Dendranthema vestitum*). **Journal of Plant Research**, v. 121, p. 215-226, 2008.

LUCAS, S. et al. The drought response displayed by a DRE-binding protein from *Triticum dicoccoides*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, p. 346-351, 2011.

MA, Y.; QIN, F. **ABA regulation of plant responses do drought and salt stresses**. In: ZHANG, D. P. Abscisic Acid: Metabolism, Transport and Signaling, Springer, p. 315-336, 2014.

MARRACCINI, P. et al. Differentially expressed genes and proteins upon drought acclimation in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 11, p. 4191-4212, 2012.

_____. *RBCS1* expression in coffee: *Coffea* orthologs, *Coffea arabica* homeologs, and expression variability between genotypes and under drought stress. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 85, 2011.

MARTINS, A. L. **História do café**. São Paulo: Contexto, 2008. 316p.

MAZZUCOTELLI, E. et al. Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. **Plant Science**, v. 174, p. 420-431, 2008.

MENDES, A. N. G. et al. Classificação botânica, origem e distribuição geográfica do cafeeiro. In: GUIMARÃES, R. J. et al. **Cafeicultura**. Lavras: UFLA/FAEPE, p. 39-99, 2002.

MISHRA, M. K.; SLATER, A. Recent advances in the genetic transformation of coffee. **Biotechnology Research International**, v. 12, p. 1-17, 2012.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 405-410, 2002.

MIZOI, J. et al. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1819, p. 86-96, 2012.

MONDEGO, J. M. C. et al. An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 30, 2011.

MONTAGNON, C. et al. Amélioration génétique du caféier *Coffea canephora* Pierre: connaissances acquises, stratégies et perspectives. **Cahiers Agricultures**, v. 21, p. 143-153, 2012.

_____. Amélioration variétale de *Coffea canephora* I: critères et methods de selection. **Plantations, Recherche, Développement**, v. 5, n. 1, p. 18-33, 1998.

MONTAGNON, C. **Optimisation des gains génétiques dans le schéma de sélection récurrente réciproque de *Coffea canephora* Pierre**. 2000. PhD Thesis - Montpellier University, 2000.

NAKASHIMA, K. et al. The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 170, 2014.

NAYAK, S. N. et al. Isolation and sequence analysis of *DREB2A* homologues in three cereal and two legume species. **Plant Science**, v. 177, p. 460-467, 2009.

OLIVEIRA, I. P. de et al. Cultura de café: histórico, classificação botânica e fases de crescimento. **Revista Faculdade Montes Belos**, v. 5, n. 4, 2012.

OVALLE-RIVERA, O. et al. Projected shifts in *Coffea arabica* suitability among major global producing regions due to climate change. **PLoS One**, v. 10, n. 4, 2015.

PELLESCHI, S. et al. Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis in mature maize leaves. **Plant, Cell & Environment**, v. 20, n. 4, p. 493-503, 1997.

PINHEIRO, H. A. et al. 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.

_____. Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora*. **Annals of Botany**, v. 96, p.101-108, 2005.

PRAKASH, N. S. et al. Analysis of genetic diversity in Indian robusta coffee genepool (*Coffea canephora*) in comparison with a representative core collection using SSRs and AFLPs. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 52, p. 333-343, 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**, v. 56, p. 263-273, 2006.

RAMAKERS, C. et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, p. 62-66, 2003.

RODRIGUES, R. R. et al. Disponibilidade hídrica no solo no desenvolvimento inicial do cafeeiro Conilon. **Coffee Science**, v. 10, n. 1, p. 46-55, 2015.

RONCHI, C. P.; DAMATTA, F. M. **Aspectos fisiológicos do café conilon**. In: FERRÃO, R. G. et al. *Café Conilon*, Incaper, 2007.

SAKUMA, Y. et al. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, p. 998-1009, 2002.

SANTOS, C. A. F. et al. Perspectives on the potential impacts of climate changes on coffee plant and bean quality. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 27, n. 2, p. 152-163, 2015.

SE-JUN, O. et al. Expression of barley *HvCBF4* enhances tolerance to abiotic stress in transgenic rice. **Plant Biotechnology Journal**, v. 5, p. 646-656, 2007.

SEKI, M. et al. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. **The Plant Journal**, v. 31, p. 279–292, 2002.

SHARMA, P. et al. Comparative *MYB* gene expression in *Brassica* species under drought stress through semi-quantitative RT-PCR. **Cruciferae Newsletter**, v. 29, p. 23-25, 2010.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress tolerance and response. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 221-227, 2007.

SILVA, P. E. M. et al. The functional divergence of biomass partitioning, carbon gain and water use in *Coffea canephora* in response to the water supply: Implications for breeding aimed at improving drought tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 87, p. 49-57, 2013.

SILVA, V. A. et al. Resposta fisiológica de clone de café Conilon sensível à deficiência hídrica enxertado em porta-enxerto tolerante. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 5, p. 457-464, 2010.

SOUZA, F. F. et al. **Características das principais variedades de café cultivadas em Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, Documentos, n. 93, 2004.

VIDAL, R. O. et al. A high-throughput data mining of single nucleotide polymorphisms in *Coffea* species expressed sequence tags suggests differential homeologous gene expression in the allotetraploid *Coffea arabica*. **Plant Physiology**, v. 154, p. 1053-1066, 2010.

VIEIRA, L. G. E. et al. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 95-108, 2006.

VIEIRA, N. G. et al. Different molecular mechanisms account for drought tolerance in *Coffea canephora* var. Conilon. **Tropical Plant Biology**, v. 6, p. 181-190, 2013.

VINECKY, F. et al. Análise *in silico* das bibliotecas de cDNA SH2 e SH3 para a identificação de genes responsivos à seca em cafeeiro. **Coffee Science**, v. 7, p. 1-19, 2012.

WANG, J. W. et al. Induced expression of DREB transcriptional factor and study on its physiological effects of drought tolerance in transgenic wheat. **Acta Genetica Sinica**, v. 33, n. 5, p. 468-476, 2006.

WANG, Q. et al. Overexpression of a rice *OsDREB1F* gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice. **Plant Molecular Biology**, v. 67, n. 6, p. 589-602, 2008.

WIDODO, W. et al. Elevated growth CO₂ delays drought stress and accelerates recovery of rice leaf photosynthesis. **Environmental and Experimental Botany**, v. 49, p. 259-272, 2003.

XU, H. et al. Overexpression of the *Rap2.4f* transcriptional factor in *Arabidopsis* promotes leaf senescence. **Science China Life Sciences**. v. 53, n. 10, p. 1221-1226, 2010.

XU, Z. S. et al. Isolation and functional characterization of *HvDREB1*- a gene encoding a dehydration-responsive element binding protein in *Hordeum vulgare*. **Journal of Plant Research**, v. 122, p. 121-130, 2009.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 781-803, 2006.

ZHOU, M. L. et al. Improvement of drought and salt tolerance in *Arabidopsis* and *Lotus corniculatus* by overexpression of a novel DREB transcription factor from *Populus euphratica*. **Gene**, v. 506, n. 1, p. 10-17, 2012.

_____. Regulation of plant stress response by dehydration responsive element binding (DREB) transcription factors. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 54, p. 9255-9279, 2010.

ZOU, C. et al. *Cis*-regulatory code of stress-responsive transcription in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 36, p. 14992-14997, 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Expressões *in silico* e *in vivo* dos genes da subfamília *DREB* de *C. canephora*, desenho dos pares de *primers* e eficiência desses pares

Tabela 1 Subgrupos (I-IV), sequências (5' → 3') e tamanhos dos amplicons (em pb) de todos os 31 pares de *primers* desenhados da subfamília *DREB* de *C. canephora* Conilon com base nas sequências codantes disponíveis no Banco de Dados Coffee Genome Hub para os experimentos de RT-qPCR. Para todos esses genes foram feitas as expressões gênicas *in silico*. Os *primers* que tiveram seus produtos amplificados e foram específicos com base na “*melting curve*” foram analisados quanto à expressão gênica *in vivo*, considerando a faixa ótima de eficiência de *primers*, igual ou superior a 89% (ver Tabela 2). Com base nas análises *in silico* e *in vivo* foram selecionados os GCs para cada uma dessas análises, destacados em cinza os mais pertinentes (...continua...).

Subgrupos de <i>DREB</i> de <i>C. canephora</i>	Expressão gênica <i>in silico</i> / desenho de <i>primers</i>	Expressão gênica <i>in vivo</i> de <i>primers</i> que amplificaram e foram específicos (“ <i>melting curve</i> ”)	Faixa ótima de eficiência de <i>primers</i>	GCs pela análise <i>in silico</i>	GCs pela análise <i>in vivo</i>	<i>Primer</i>	Sequência (5' → 3')	pb
I	Cc03_g07870	✓	✓			F R	TTCCGGACCTGAAACACCAA GCAGGCAGGCCTTGTGATAT	100
	Cc05_g06840	✓	✓		✓	F R	ACCCTCCAACCTCCCATGAC TGGCAGCTCTGGGATGTACA	110
	Cc07_g15390	✓	✓	✓		F1 R1	TCCAAACCTTCGGCATCAAT GAATCGGCCAAGCTTTGACA	105
	Cc08_g15980	✓	✓	✓	✓	F R	CTGAAGCAGCAGCGTATGCA TCGCGAAGATTGGGAAAATT	85
	Cc10_g07460				✓	F R	CTATCAAGGGCGCCAATAC GTCGACTGGGATGAGCAACA	70

Tabela 1, continua.

Subgrupos de DREB de <i>C. canephora</i>	Expressão gênica <i>in silico</i> / desenho de primers	Expressão gênica <i>in vivo</i> de primers que amplificaram e foram específicos (“melting curve”)	Faixa ótima de eficiência de primers	GCs pela análise <i>in silico</i>	GCs pela análise <i>in vivo</i>	Primer	Sequência (5' → 3')	pb
II	Cc06_g12520			✓		F R	TACGATACGGCCGAGAAAGC GGCGGGTTATCAGGGAAATT	95
	Cc07_g06220	✓	✓	✓		F R	GAGGGAGGTGGAGGAATTGG TCTAATCTCCGCCACCCATT	105
	Cc08_g07780					F R	GCACCTGCTTCCTCTTCGAT ACACCCATTTCCCCCACTTT	85
	Cc10_g04710	✓	✓	✓	✓	F R	GCCCTTCTGCGAGGCTTAAC TAGCAGCCGACAGACAAGTCA	75
	Cc10_g09120	✓				F R	GCAGCACGTCCCAGAAAAGA CGAATTTCCGACACCCATT	70
	Cc10_g10960	✓				F R	CGTTCCCTGAAAGCCTAGTC CGTTGTGGTGGTGAAACTG	87
	III	Cc01_g09680					F R	GAGACTCGCCACCCCATTTA TTGTTTGGCTCACGCATTTTC
Cc02_g03420		✓	✓	✓		F R	ACCCTGACGATCCTCCTCAA GACCCAGAAGCAGTGGCAAT	70
Cc02_g03430				✓		F R	CAATGCCTGCAAAGCCAATT TTTTCTGCCTGCACGTTTC	80
Cc02_g24810		✓	✓	✓		F R	GCCCGATCTTTCTTTGATG GATGATGAACCGTGGAAGCA	75

Tabela 1, continua.

Subgrupos de DREB de <i>C. canephora</i>	Expressão gênica <i>in silico</i> / desenho de primers	Expressão gênica <i>in vivo</i> de primers que amplificaram e foram específicos (“melting curve”)	Faixa ótima de eficiência de primers	GCs pela análise <i>in silico</i>	GCs pela análise <i>in vivo</i>	Primer	Sequência (5' → 3')	pb
III	Cc02_g39490					F R	GCAAATGGGTGTCGGAAATT TCTCTGGGCTTGGGAAAGAA	75
	Cc04_g02760			✓		F R	GCGAGCCACGTAAAAAATCG AGCCACGTCATGGGCTCTAG	80
	Cc06_g05340					F R	GATTCGGGAGCCAAGAACAC GAGCAAGTGCAGCCACATCA	95
	Cc06_g10260			✓		F1 R1	TGACCCTCCCCACTCTGAAA GTGATGCATGTGAGCGGAAT	70
	Cc08_g09520					F1 R1	TCCTGATCAGCAGCTGTGGAT AGACTCAAAGCCGCTCGAAA	85
	Cc08_g12160					F R	GCCACTCCGCTTTCCTCAA CCGCTGCAGCTTGGATATCT	90
	Cc08_g13960	✓	✓		✓	F R	GCCCAAAGAGCCATCAATTC CTTCCTCCAGCTCGCTTCT	75
	Cc08_g13970	✓	✓		✓	F R	GGCTTGGCTGGAGAAGATGA GGCCATGTCCACAAGCAAAT	75
IV	Cc02_g05970					F1 R1	AAGCAGAGGCGCCTGTTAAG TCCCACGCCAAAGTATCCAA	70
	Cc02_g06230					F R	CCCCGCTACCGTACAACAGT TGCGGTTGTGGCTCTTGTA	75

Tabela 1, conclusão.

Subgrupos de DREB de <i>C. canephora</i>	Expressão gênica <i>in silico</i> / desenho de primers	Expressão gênica <i>in vivo</i> de primers que amplificaram e foram específicos (“melting curve”)	Faixa ótima de eficiência de primers	GCs pela análise <i>in silico</i>	GCs pela análise <i>in vivo</i>	Primer	Sequência (5' → 3')	pb
IV	Cc06_g00780	✓				F R	GGGATGTATGCGAGGCAAAG CCCCAAGTCCGCTGTCTAAC	75
	Cc06_g16660					F1 R1	AAAGGAGGGCCTCAGAATGC ACCCAGCCACAGTCTTGTT	115
	Cc09_g03140					F R	GCCCAAGAAAGAAGCAGCAA TGCCTCTCATGCACCCTTTT	80
	Cc10_g02270	✓				F R	GACCGCAGTGGAAATGGAAA TTGCCTCTCATGCAGCCTTT	80
	Cc10_g14150				✓	F R	GCTGAAATACGGGAACCCAAA TATGCCAGGGCAGCTTCAAT	80
	Cc10_g14160	✓		✓	✓	F1 R1	TGGCACTGCAAGGTCGATAA GCCAAGACAGTGGGAACCAA	105

Tabela 2 Eficiência (%) dos pares de *primers* nos tecidos foliar e radicular, desenhados para as análises de expressão gênica *in vivo* (RT-qPCR). Como intervalo ótimo de eficiência foram considerados os valores iguais ou superiores a 89%.

Subgrupos	Primers	Tecido	Eficiência (%)
I	Cc03_g07870	Folha	98
	Cc05_g06840	Folha	94
	Cc07_g15390	Folha	100
		Raiz	100
	Cc08_g15980	Folha	95
		Raiz	94
II	Cc07_g06220	Folha	89
	Cc10_g04710	Folha	100
		Raiz	91
III	Cc02_g03420	Raiz	100
	Cc02_g24810	Folha	100
		Raiz	92
	Cc08_g13960	Folha	93
	Cc08_g13970	Folha	89
IV	Cc10_g14160	Folha	99
		Raiz	89

APÊNDICE B – Exemplos de curvas de dissociação para os pares de primers referentes aos genes *DREB* de *C. canephora*

Figura 1 Curva de dissociação (“melt curve”) pela RT-qPCR para o primer Cc01_g09680, obtido pela RT-qPCR, utilizando um mix de amostras de todos os clones (14, 22, 73 e 120) de *C. canephora* Conilon para cada condição (I e NI) e tecido (folha e raiz).

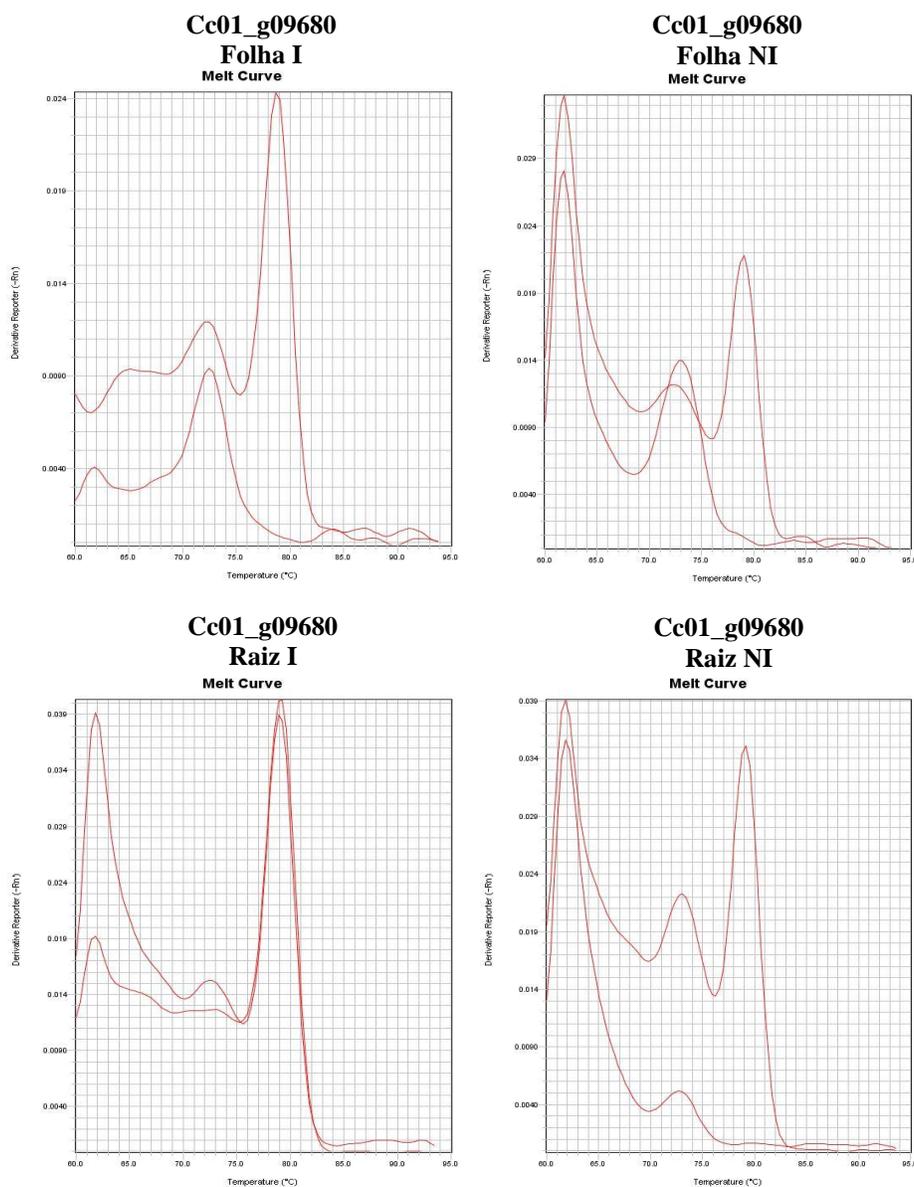
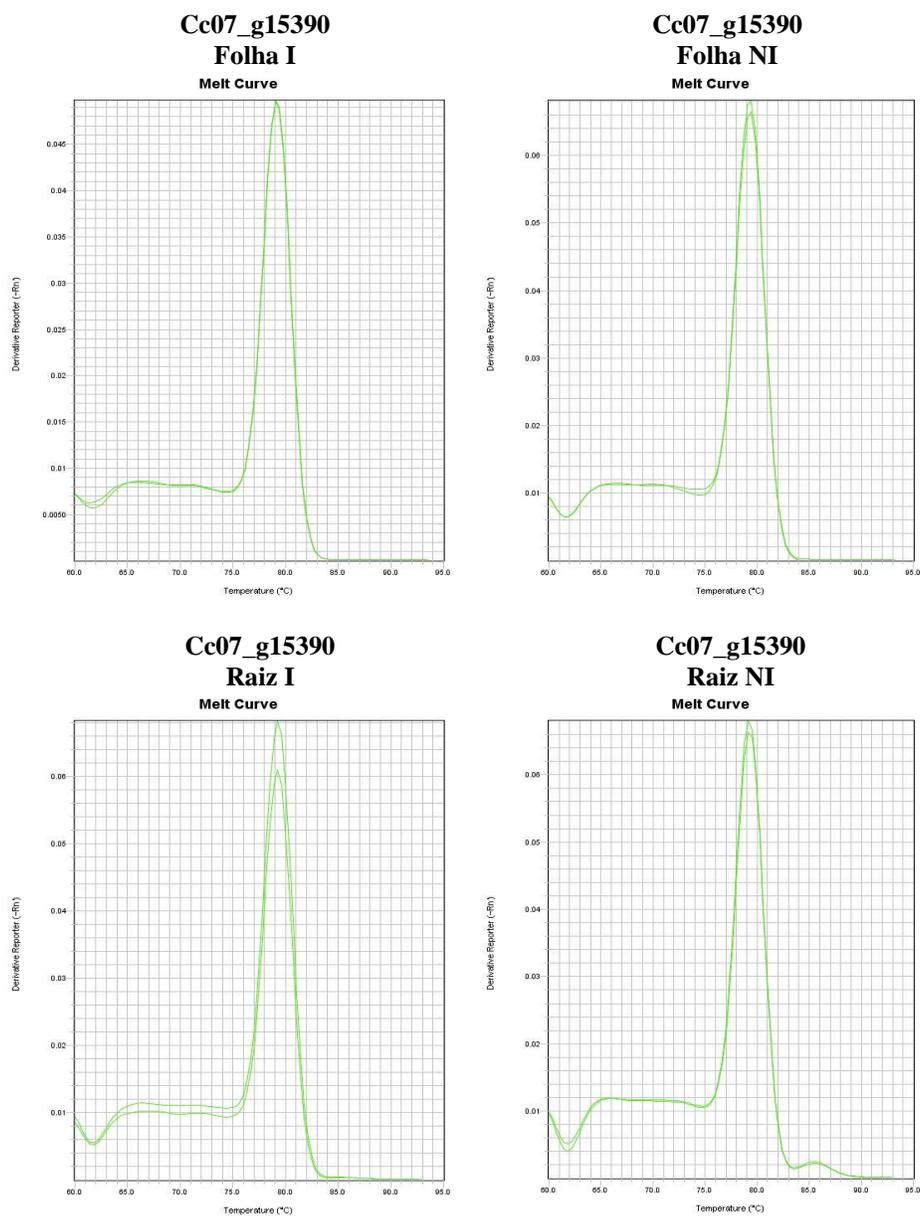


Figura 2 Curva de dissociação (“*melt curve*”) pela RT-qPCR para o *primer* Cc07_g15390, obtido pela RT-qPCR, utilizando um mix de amostras de todos os clones (14, 22, 73 e 120) de *C. canephora* Conilon para cada condição (I e NI) e tecido (folha e raiz).



ANEXO

ANEXO A – Descrição dos dados de RNA-Seq de *C. canephora*Tabela 1 Plataforma, número e comprimento dos *reads* de ESTs/RNA-Seq de diferentes acessos e tecidos (raiz, estame, pistilo, folha, caule e flor) de *C. canephora*

Espécie	Acesso	Tecido/ condição fisiológica	Plataforma utilizada	Número de <i>reads</i>	Comprimento do <i>read</i>
<i>C. canephora</i>	--	Mix	Sanger	255.032	--
	DH 200-94	Folhas velhas		28.179.777	76
	DH 200-94	Folhas velhas		31.049.449	76
	DH 200-94	Caule, flor		28.566.581	76
	DH 200-94	Caule, flor		30.498.332	76
	DH 200-94	Folhas jovens	Solexa	25.899.759	76
	DH 200-94	Folhas jovens		28.769.788	76
	cv BP961	Pistilo		27.710.036	100
	acc. T3518	Raiz		31.038.821	100
	cv BP961	Estame		22.087.867	100
	acc. T3518	Folha		53.018.844	100

Fonte: Coffee Genome Hub (<http://coffee-genome.org/coffeacanephora>).