

IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE DEIDRINAS E AQUAPORINAS EM RAÍZES DE CAFÉ SOB ESTRESSE HÍDRICO

Adriana Brombini dos Santos¹; Paulo Mazzafera²

¹ Aluna pós-graduação (doutorado), Depto. Biologia Vegetal, IB-Unicamp, Campinas/SP, adribsan@yahoo.com.br

² Professor Titular, Depto. Biologia Vegetal, IB-Unicamp, Campinas/SP, pmazza@unicamp.br

RESUMO: O estresse hídrico desencadeia importantes alterações no padrão de expressão gênica e, juntamente com parâmetros fisiológicos e bioquímicos, contribuem para explicar os mecanismos que determinam a tolerância à seca nas plantas. O acúmulo de transcritos dos genes MIPs (aquaporinas) e deidrininas sob condição de déficit hídrico sugere uma relação entre a atividade desses genes e a tolerância à seca nas plantas. Considerando a importância econômica do café e o enorme impacto que o déficit hídrico impõe à cultura, o objetivo desse estudo foi estabelecer uma correlação entre o padrão de expressão das deidrininas (Dhs) e aquaporinas e o grau de tolerância à seca em *Coffea* utilizando materiais contrastantes. A identificação e análise das sequências dos genes foram obtidas no banco EST-Genoma Café. Para as análises de expressão na raiz, plantas de café arábica (sensível) e café robusta (tolerante) foram submetidas a estresse hídrico ($\Psi_w = -2,0 \pm 0,2$ MPa) por suspensão da irrigação. Os resultados obtidos para Dhs indicaram que o gene Dh2 não se expressa em órgãos vegetativos da planta sob condição normal de irrigação, mas tem expressão induzida nas raízes sob estresse hídrico. Do mesmo modo, a expressão do gene Dh3 foi aumentada nas raízes sob estresse, principalmente em café robusta (tolerante). As aquaporinas PIP2;1 e PIP2;2 também exibiram aumento no acúmulo de transcritos nas raízes das plantas de café sob déficit hídrico em relação às irrigadas, e foi significativamente maior na cultivar tolerante (Apoatã). Em conclusão, os resultados sugerem uma correlação positiva entre aumento na expressão das deidrininas e aquaporinas e tolerância à seca, reforçando a importância desses genes para a regulação e/ou manutenção do balanço hídrico celular.

Palavras-chave: aquaporinas, deidrininas, *Coffea*, estresse hídrico, tolerância à seca

IDENTIFICATION AND EXPRESSION ANALYSIS OF DEHYDRINS AND AQUAPORINS IN THE ROOTS OF COFFEE UNDER DROUGHT STRESS

ABSTRACT: Drought stress triggers significant changes in the pattern of gene expression and together with biochemical and physiological parameters contribute to explain the mechanisms that determine drought tolerance in plants. The transcript accumulation of genes MIPs (aquaporins) and dehydrins under water stress conditions suggests a relationship between the activity of these genes and drought tolerance in plants. Considering the economic importance of coffee and the great impact that water deficit imposes on the culture, the aim of this study was to establish a correlation between the pattern of expression of dehydrins (Dhs) and aquaporins and the degree of tolerance in *Coffea* contrasting for drought tolerance. The identification and analysis of gene sequences were made using data from the Genome Database EST-Coffee. For analysis of expression in root, arabica coffee plants (sensitive) and robusta coffee (tolerant) were subjected to water stress ($\Psi_w = -2.0 \pm 0.2$ MPa) by withholding water. The results for Dh2 gene indicated that it is not expressed in vegetative organs under normal condition of irrigation, but has expression induced in roots under water stress. Similarly, Dh3 expression was increased in roots under stress, especially in Robusta coffee (tolerant). Aquaporins PIP2, 1 and PIP2; 2 also exhibited increased transcript accumulation in roots of coffee plants under drought, and was significantly higher in the tolerant cultivar (Apoatã). In conclusion, the results suggest a positive correlation between increased expression of dehydrins and aquaporins and drought tolerance, confirming the importance of these genes to regulate and / or maintenance of cellular water balance.

Key words: aquaporins, dehydrins, *Coffea*, water stress, drought tolerance

INTRODUÇÃO

A seca constitui um dos estresses abióticos de maior impacto para as plantas, em ambientes naturais ou na agricultura, induzindo diversas alterações metabólicas. Neste sentido, as plantas terrestres evoluíram uma série de mecanismos para tolerar o déficit hídrico, os quais são recrutados em função do tempo e da intensidade do estresse (Santos, 2009). O déficit hídrico desencadeia importantes alterações no padrão de expressão gênica e, juntamente com parâmetros fisiológicos e bioquímicos, ajudam a explicar os mecanismos que determinam a tolerância à seca. Desse modo, genes envolvidos em processos de proteção contra danos celulares (deidrininas) e no controle do fluxo de água na célula (aquaporinas) são tipicamente responsivos a eventos de estresse hídrico e têm sido importantes alvos de estudos que objetivam correlacionar expressão de genes e tolerância à seca nas plantas.

As deidrininas (Dhs) fazem parte de um grande grupo de proteínas hidrofílicas conhecidas como LEA (*Late Embryogenesis Abundant*). As Dhs acumulam-se tipicamente em tecidos da planta que sofreram desidratação, tal como durante o processo de maturação de sementes, e também em tecidos vegetativos submetidos a estresses ambientais como seca, baixas temperaturas e salinidade (Close, 1997). A ampla distribuição das Dhs em vários tecidos durante o crescimento da planta e em resposta a estresses associados à dessecação celular sugere que tais proteínas desempenhem uma função essencial no desenvolvimento das plantas e na tolerância a estresses (Rorat, 2006).

As aquaporinas (AQPs) constituem um grupo de proteínas canais que atuam no transporte de água e/ou pequenos solutos neutros (uréia, ácido bórico entre outros) e gases (amônia e dióxido de carbono) através de membranas (Tyerman *et al.*, 2002; Maurel *et al.*, 2008). Pertencem a uma superfamília de proteínas denominadas MIPs (*Major Intrinsic Proteins*), as quais estão presentes em todos os tipos de organismos, incluindo bactérias, animais e plantas (Jang *et al.*, 2004). As AQPs facilitam a difusão da água exercendo um fino controle do fluxo de água intra e intercelular nas plantas (Maurel *et al.*, 1997). As AQPs apresentam-se sob múltiplas isoformas nas plantas.

O café é a mais importante ‘commodity’ agrícola mundial, movimentando mais de 90 bilhões de dólares/ano e envolvendo cerca de 500 milhões de pessoas em sua cadeia produtiva, do cultivo ao produto final para o consumo (Rezende & Rosado, 2004). Das mais de 90 espécies já descritas para o gênero, apenas duas – *Coffea arabica* L. (café arábica) e *Coffea canephora* Pierre ex Froehner (café robusta) – dominam economicamente o comércio mundial de café, contribuindo com 62% e 38% da produção total, respectivamente (DaMatta & Ramalho, 2006).

A seca constitui o principal fator climático causador de estresse para o cafeeiro, havendo registros de que em regiões produtoras onde a irrigação era ausente, a produção de café alcançou queda de até 80% na safra em anos de seca prolongada.

Considerando o atual cenário de mudanças climáticas globais e a tendência nas últimas décadas de expansão da cafeicultura brasileira para regiões tais como o cerrado mineiro e o oeste baiano, *a priori* consideradas pouco aptas ao desenvolvimento da cultura (Silva & Mazzafera, 2008), torna-se de fundamental importância a identificação e uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares que determinam a tolerância à seca em *Coffea*, visando potencializar as estratégias de melhoramento e seleção de cultivares mais tolerantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Análise e identificação de genes relacionados ao estresse hídrico: deidrininas (Dhs) e aquaporinas (AQPs)

A identificação e a seleção das sequências dos genes foram realizadas através de buscas no banco EST-Genoma Café, composto por cerca de 130.000 etiquetas de sequências expressas e inclui 3 espécies de café: *C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa* (Vieira *et al.*, 2006). A busca das sequências foi realizada através das palavras-chave “dehydrin” e “aquaporin”. Sequências com “e-value” maior que $1e^{-5}$ foram “clusterizadas” (Phrap ou CAP3), analisadas quanto à qualidade de suas bases (phred > 20) e corrigidas manualmente. Sequências consenso obtidas pelos alinhamentos (Clustal W) foram analisadas com auxílio da ferramenta Blast através do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e suas prováveis ORFs (*Open Reading Frame*) determinadas a partir de comparações com genes homólogos de outras espécies.

Estudo de tolerância à seca em duas espécies de *Coffea* e análises de expressão gênica

Plantas de café das espécies *C. arabica* (cv. Catuaí Vermelho IAC81 e cv. Mundo Novo IAC464) e *C. canephora* (cv. Apoatã IAC3600-8.) e uma enxertia da cv. Mundo Novo IAC464 sobre a cv. Apoatã IAC foram submetidas a um tratamento de estresse hídrico por suspensão completa da irrigação. As plantas do tratamento controle foram mantidas sob regime normal de irrigação. As plantas foram cultivadas em vasos de 3,8 L (citrovasos) contendo uma mistura de solo e areia (1:1, v/v). O experimento foi composto por 3 plantas/cultivar/tratamento e os sintomas de murcha foliar foram monitorados até que as plantas atingissem um potencial hídrico de -2,0 MPa no “predawn” ($\Psi_w = -2,0 \pm 0,2$ MPa). As coletas das raízes ocorreram entre o 9º e o 11º dia após a última rega e o material foi mantido em N₂ líquido e armazenado a -80°C. O experimento foi conduzido em casa de vegetação (Instituto de Biologia – UNICAMP) com plantas de cerca de 10 meses.

As análises de expressão por RT-PCR semi-quantitativa foram realizadas com cDNA obtido a partir de 5,0 µg de RNA total tratado com DNase. A normalização do ensaio foi feita utilizando os genes constitutivos ACTINA e GAPDH de café (Cruz *et al.*, 2009).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca por sequências no Banco EST-Genoma Café (Vieira *et al.*, 2006) objetivou a identificação de possíveis genes pertencentes à família das deidrininas e das aquaporinas e, posteriormente, a análise do padrão de expressão dos genes em cultivares de café com diferentes graus de tolerância à seca.

Os resultados obtidos para as Dhs identificaram as sequências dos genes Dh1, Dh2 e Dh3 previamente descritas por Hinniger *et al.* (2006) em *C. canephora*. Adicionalmente, foram encontrados genes homólogos nas

espécies *C. arabica* e *C. racemosa*, além de uma terceira forma variante ou polimórfica do gene Dh1 (CcDh1c) identificada pelo presente estudo (tabela 1). As possíveis formas polimórficas dos genes Dhs nas espécies de café foram caracterizadas a partir de alterações pontuais na sequência das bases na região codificadora e nas regiões 5' e 3' UTR (*UnTranslated Region*).

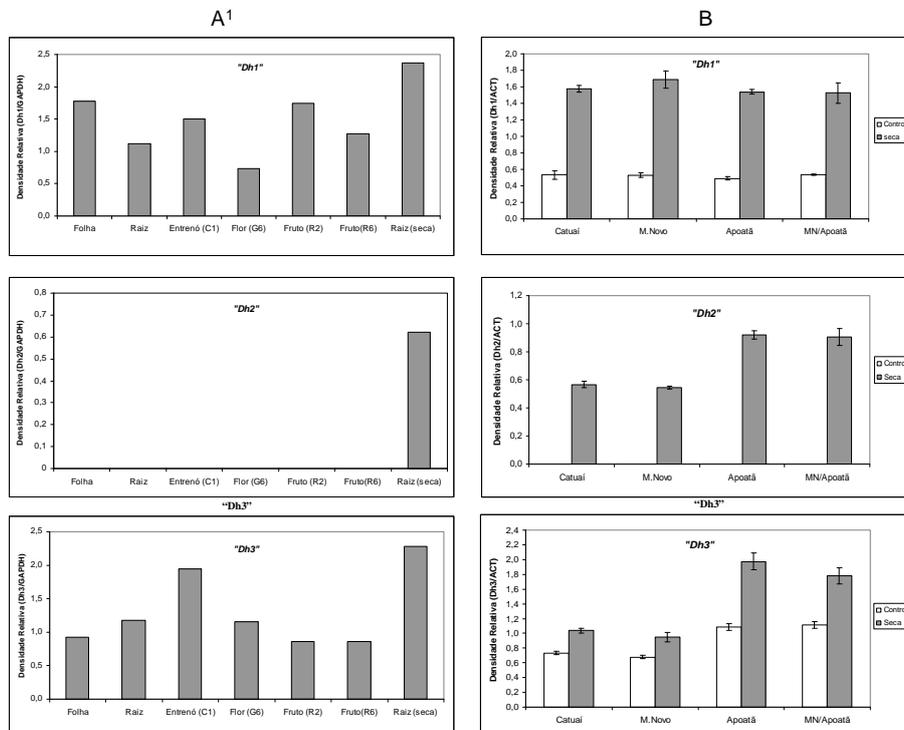
Tabela 1: Resultado da busca por sequências de deidrinas no banco EST-Genoma Café.

Deidrinas de Café				
Espécies	Total reads	Gene	Nº reads/gene	Tam. ORF (pb)
<i>C. arabica</i>	45	"CaDh1a" e "CaDh1b"	11 e 5	516
		"CaDh3a" e "CaDh3b"	11 e 14	681 e 675
<i>C. canephora</i>	81	CcDh1a , CcDh1b e "CcDh1c"	10, 4 e 13	516, 525 e 516
		CcDh2a	21	486
		CcDh3	5	681
<i>C. racemosa</i>	11	"CrDh1a"	8	516

Em negrito os genes cujas sequências foram anteriormente descritas por Hinniger *et al.* (2006).

O padrão de expressão do gene Dh1 evidenciou a presença de transcritos em todos os órgãos analisados (fig. 1A), embora um acúmulo preferencial nos frutos, folhas e ramos tenha sido verificado. O acúmulo de transcritos do gene Dh1 já havia sido relatado por Hinniger *et al.* (2006) durante os últimos estágios de desenvolvimento dos frutos dos cafês robusta e arábica, além de uma expressão mais discreta em diversos outros tecidos como ramos, folha jovem e flor. Contrariamente aos resultados observados por Hinniger *et al.* (2006) em frutos de café em desenvolvimento, o gene Dh2 não foi detectado em nenhum dos dois estágios de frutos imaturos (R2: precoce; R6: tardio) analisados nesse trabalho (fig. 1A). O gene Dh3 exibiu uma expressão constitutiva entre os diferentes órgãos, com uma tendência de acúmulo nos ramos, conforme se observa na figura 1A.

A ampla distribuição de Dhs em tecidos vegetativos de café sob condições normais de crescimento constitui importante evidência de que essas proteínas não apenas estão relacionadas a situações de estresse, podendo exibir expressão constitutiva e diferencial associada ao tipo de órgão e/ou célula, bem como a distintos estágios de desenvolvimento (Santos, 2009). Estudos recentes desenvolvidos em *Solanum sp.* mostraram que na ausência de estresse a expressão no nível da proteína de deidrinas do tipo-SK (caso da Dh3 de café), foi fortemente detectada em órgãos como flor, ramos, tubérculos e folhas jovens (Rorat *et al.*, 2004; Rorat *et al.*, 2006).



(1) Análises de expressão realizadas em diferentes órgãos de *C. arabica* (cv. Mundo Novo IAC464), sob regime normal de irrigação.

Figura 1: Padrão de expressão de Dhs em diversos órgãos de cafeeiros irrigados (A) e nas raízes de plantas submetidas a estresse hídrico (-2,0 MPa) em diferentes cultivares de café (B). Barra = erro-padrão.

A análise de expressão das “Dhs” na raiz de plantas submetidas a estresse hídrico mostrou um perfil bastante heterogêneo entre os diferentes genes e em relação às cultivares de café arábica e robusta. A expressão dos genes Dh1, Dh2 e Dh3 foi aumentada sob condição de estresse na raiz em todas as cultivares, e em maior amplitude nos genes Dh1 e Dh3 (fig. 1B). Paralelamente, pode-se constatar uma nítida diferença no acúmulo de transcritos dos genes Dh2 e Dh3 na cv. Apoatã e na enxertia (raiz de Apoatã) em relação as duas cultivares de café arábica.

Diversos estudos têm reportado uma correlação positiva entre o acúmulo de transcritos e/ou proteínas de Dhs e tolerância a estresses tais como frio, seca e salinidade (Xu *et al.*, 1996; Nylander *et al.*, 2001; Allagulova *et al.*, 2003; Khurana *et al.*, 2008). Nesse sentido, o maior acúmulo de transcritos de Dh2 e Dh3 observado nas raízes de Apoatã (café robusta) poderia contribuir para a maior tolerância dessa cultivar em condição de limitação hídrica, uma vez que a presença das deidrininas poderia desempenhar algum tipo de ação protetora contra os danos induzidos pela seca, auxiliando na manutenção de um potencial osmótico celular mais adequado.

A diversificação das AQPs nas plantas, em contraste com cerca de apenas 10 identificadas em mamíferos, inclui múltipla localização sub-celular e expressão diferencial ao longo do desenvolvimento da planta e sob condição de estresse, sugerindo um importante papel dessas proteínas para balanço hídrico nas plantas (Johansson *et al.*, 2000; Maurel *et al.*, 2002). Embora a correlação entre as múltiplas isoformas de AQPs e suas funções integradas em condições de estresse não estejam completamente estabelecidas (Jang *et al.*, 2007), diversos trabalhos têm evidenciado importantes alterações no padrão de expressão desses genes sob tais condições, indicando que esses genes são regulados pelo status de água nas plantas, e que, portanto, poderiam estar envolvidos em mecanismos de tolerância à seca nas plantas (Maurel, 1997; Jang *et al.*, 2007).

Os genes identificados nas três espécies de café como homólogos das AQPs (tabela 2) foram classificados como membros das subfamílias PIP (*Plasma Membrane Intrinsic Protein*) e TIP (*Tonoplast Intrinsic Protein*), as classes mais abundantes dentre as AQPs de plantas. O agrupamento das AQPs foi baseado em análises de similaridade na sequência primária das proteínas de café comparativamente a sequências de AQPs em outras espécies de plantas (Blastp), aliadas a informações posicionais de cada uma delas em uma árvore filogenética (Santos, 2009).

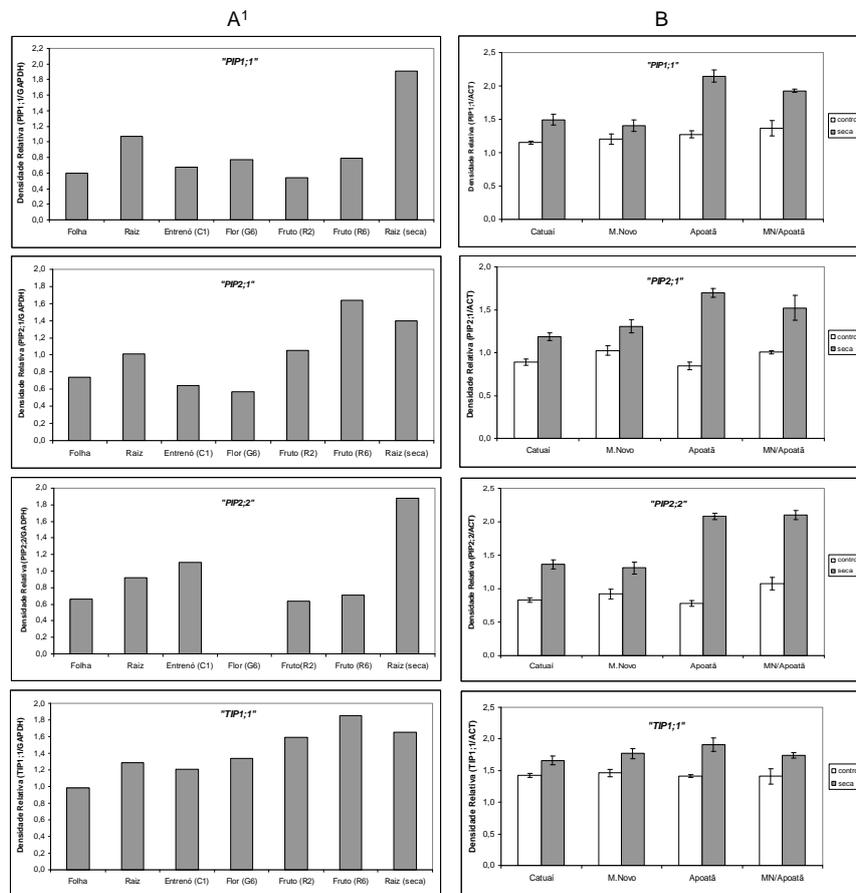
Tabela 2: Resultado da busca por sequências de aquaporinas no banco EST-Genoma Café.

Aquaporinas de Café				
Espécies	Total reads	Gene	Nº reads/gene	Tam. ORF (pb)
<i>C. arabica</i>	438	"CaPIP1;1"	46	858
		"CaPIP2;1"	13	846
		"CaPIP2;2"	19	864
		"CaTIP1a" e "CaTIP1b"	107 e 18	771 e 771
<i>C. canephora</i>	192	"CcPIP1;1"	30	858
		"CcPIP1;2"	2	852
		"CcPIP2;1"	80	846
		"CcPIP2;2"	4	846
		"CcTIP1;1"	39	771
<i>C. racemosa</i>	63	"CrPIP1;1"	11	858
		"CrPIP2;1"	10	846
		"CrTIP1;1"	20	771
		"CrTIP1;2"	3	753

Os resultados obtidos para o padrão de expressão das AQPs em café evidenciou a presença dos genes (PIP1;1, PIP2;1, PIP2;2 e TIP1;1) em praticamente todos os órgãos, sendo que os genes PIP2;1 e PIP1;1 tenderam a ser preferencialmente expressos nos frutos ou nas raízes, respectivamente (fig. 2A). A correlação entre certas isoformas específicas de AQPs e órgãos vegetais já havia sido relatada por um estudo sobre o perfil de expressão das 35 AtMIPs empregando microarranjos em folhas de roseta de Arabidopsis, comparativamente a outros tecidos como raízes e flores, verificando-se que algumas isoformas eram expressas especificamente em raízes ou flores, enquanto nenhuma foi específica de folhas (Alexandersson *et al.*, 2005).

As análises de expressão das AQPs nas raízes dos cafeeiros indicam que os genes PIP1;1, PIP2;1, PIP2;2 e TIP1;1 foram induzidos pelo estresse hídrico em todas as cultivares estudadas (fig. 2B). Entretanto, observou-se que as plantas de café robusta (Apoatã e enxertia), de modo geral, tenderam a exibir um maior acúmulo de transcritos desses genes em relação às plantas de café arábica (Catuaí Vermelho e Mundo Novo). Tal constatação reforça o importante papel dessas proteínas na regulação do fluxo de água nas células e sua contribuição na tomada de água pelas raízes em condições de baixa disponibilidade hídrica.

O estresse hídrico parece influenciar fortemente a expressão dos genes MIPs. Embora a relação entre estresse e regulação dos genes MIP ainda não esteja bem compreendida, autores como Maurel (1997) sugerem que mecanismos de tolerância à seca poderiam envolver a participação dessas proteínas.



(1) Análises de expressão realizadas em diferentes órgãos de *C. arabica* (cv. Mundo Novo IAC464), sob regime normal de irrigação.

Figura 2: Padrão de expressão de AQPs em diversos órgãos de cafeeiros irrigados (A) e nas raízes de plantas submetidas a estresse hídrico (-2,0 MPa) em diferentes cultivares de café (B). Barra = erro-padrão.

A manipulação genética de AQPs em plantas parece constituir uma importante estratégia para a elucidação das funções dessas proteínas na célula. Com efeito, resultados obtidos em tabaco e *A. thaliana* utilizando construções antisense para genes PIPs indicaram a incapacidade das plantas recuperarem-se após o estresse hídrico, sugerindo a importância crítica dessas proteínas durante esse processo (Martre *et al.*, 2002; Siefritz *et al.*, 2002). Lian *et al.* (2004) estudaram uma proteína PIP de arroz (RWC3), cuja expressão é induzida por alterações osmóticas especificamente em uma cultivar de arroz tolerante à seca, e verificaram que a super-expressão desse gene em uma cultivar sensível, sob o controle de um promotor estresse-induzível, foi capaz de melhorar o desenvolvimento da planta transgênica sob condições de estresse.

CONCLUSÕES

Os resultados das análises de expressão para deidrinases e aquaporinas reforçam o papel fundamental dessas proteínas para a regulação e manutenção do conteúdo hídrico celular, em condição de déficit hídrico ou não. A significativa presença de transcritos desses genes nos diversos órgãos das plantas de café sob condições adequadas de cultivo evidencia sua importância para a manutenção da homeostase celular. Embora os mecanismos de ação das deidrinases e proteínas MIPs durante o estresse hídrico não estejam completamente elucidados, diversos trabalhos têm sugerido uma efetiva correlação com tolerância à seca em plantas. Com efeito, a análise de expressão do gene Dh2 indicou que o mesmo foi exclusivamente induzido nas raízes de café sob déficit hídrico e preferencialmente expresso em Apoaã (plantas pé franco e enxertadas), o que poderia estar relacionado à maior tolerância de Apoaã à seca quando comparada às cultivares de café arábica. Do mesmo modo, PIP2;1 e PIP2;2 também exibiram um acúmulo de transcritos maior na cultivar Apoaã, comparativamente ao café arábica. Embora aspectos relativos ao sistema radicular do café robusta (profundidade da raiz) possam estar associados a um melhor desempenho das plantas sob condições de

limitação hídrica (DaMatta & Ramalho, 2006), permitindo uma exploração mais efetiva do perfil do solo para a captação de água, os resultados obtidos em café sugerem uma correlação positiva entre expressão Dhs/AQPs e tolerância à seca e reforçam a importância desses genes durante o déficit hídrico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDERSSON, E., FRAYSSE, L., SJÖVALL-LARSEN, S. *et al.* Whole gene family expression and drought regulation of aquaporins. *Plant Mol. Biol.*, v. 59, p. 469-484, 2005.
- ALLAGULOVA, C.R., GIMALOV, F.R., SHAKIROVA, F.M. *et al.* The plant dehydrins: structure and putative functions. *Biochemistry (Moscow)*, v. 68, p. 945-951, 2003.
- CLOSE, T.J. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol. Plant.*, v. 100, p. 291-296, 1997.
- CRUZ, F., KALAOUN, S., NOBILE, P. *et al.* Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. *Mol Breeding*, v. 23, p. 607-616, 2009.
- DAMATTA, F.M. & RAMALHO, J.D.C. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. *Braz. J. Plant Physiol.*, v. 18, p. 55-81, 2006.
- HINNIGER, C., CAILLET, V., MICHOUX, F. *et al.* Isolation and characterization of cDNA encoding three dehydrins expressed during *Coffea canephora* (robusta) grain development. *Ann. Bot.*, v. 97, p. 755-765, 2006.
- JANG, J.Y., KIM, D.G., KIM, Y.O. *et al.* An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, v. 54, p. 713-725, 2004.
- JANG, J.Y., RHEE, J.Y., KIM, D.G. *et al.* Ectopic expression of a foreign aquaporin disrupts the natural expression patterns of endogenous aquaporin genes and alters plant responses to different stress conditions. *Plant Cell Physiol.*, v. 48, p. 1331-1339, 2007.
- JOHANSSON, I., KARLSSON, M., LARSSON, C. *et al.* The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochem. Biophys. Acta*, v. 1465, p. 324-342, 2000.
- KHURANA, P., VISHNUDASAN, D. & CHHIBBAR, A.K. Genetic approaches towards overcoming water deficit in plants-special emphasis on LEAs. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, v. 14, p. 277-298, 2008.
- LIAN, H.L., YU, X., YE, Q. *et al.* The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. *Plant Cell Physiol.*, v. 45, p. 481-489, 2004.
- MARTRE, P., MORILLON, R., BARRIEU, F. *et al.* Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiol.*, 130:2101-2110, 2002.
- MAUREL, C., 1997. Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, v. 48, p. 399-429, 1997.
- MAUREL, C., CHRISPEELS, M.J., LURIN, C. *et al.* Function and regulation of seed aquaporins. *J. Exp. Bot.*, v. 48, p. 421-430, 1997.
- MAUREL, C., JAVOT, H., LAUVERGEAT, V. *et al.* Molecular physiology of aquaporins in plants. *Int. Rev. Cytol.*, v. 215, p. 105-148, 2002.
- MAUREL, C., VERDOUCQ, L., LUU, D. *et al.* Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annu. Rev. Plant Biol.*, v. 59, p. 595-624, 2008.
- NYLANDER, M., SVENSSON, J., PALVA, E.T. *et al.* Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, v. 45, p. 263-279, 2001.
- REZENDE, A.M. & ROSADO, P.L. A informação no mercado de café. In: Zambolim L, editor. Produção integrada de café, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.
- RORAT, T. Plant dehydrins – tissue location, structure and function. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, v. 11, p. 536-556, 2006.
- RORAT, T., GRYGOROWICZ, W.J., IRZYKOWSKI, W. *et al.* Expression of KS-type dehydrins is primarily regulated by factors related to organ type and leaf developmental stage during vegetative growth. *Planta*, v. 218, p. 878-885, 2004.
- RORAT, T., SZABALA, B.M., GRYGOROWICZ, W.J. *et al.* Expression of SK3-type dehydrin in transporting organs is associated with cold acclimation in *Solanum* species. *Planta*, v. 224, p. 205-221, 2006.
- SIEFRITZ, F., TYREE, M.T., LOVISOLO, C. *et al.* PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. *Plant Cell*, v. 14, p. 869-876, 2002.
- SILVA, E.A. & MAZZAFERA, P. Influences of temperature and water in the coffee culture. *Am. J. Plant Sci. Biotechnol.*, v. 2, p. 32-41, 2008.
- SANTOS, A.B. Caracterização fisiológica e molecular da tolerância à seca e sua relação com o sistema radicular em espécies de *Coffea*. Dissertação de mestrado, Campinas, 2009.
- TYERMAN, S.D., NIEMIETZ, C.M. & BRAMLEY, H. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell Environ.*, v. 25, p. 173-194, 2002.
- VIEIRA, L.G.E., ANDRADE, A.C., COLOMBO, C.A. *et al.* Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Braz. J. Plant Physiol.*, v. 18, p. 95-108, 2006.
- XU, D., DUAN, X., WANG, B. *et al.* Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol.*, v. 110, p. 249-257, 1996.