

ESTUDO DAS FAMÍLIAS GÊNICAS *CcPYL*, *CcPP2C* e *CcSnRK2*: COMPONENTES CENTRAIS NA VIA ABA-DEPENDENTE PARA A RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO EM *COFFEA CANEPHORA*¹

Michelle Guitton Cotta², Stéphanie Bocs³, Erica Cristina Silva Rego⁴, Tatiana Santos Costa⁵, Sinara Oliveira de Aquino⁶, Fernanda De Araújo Carneiro⁷, Dominique This⁸, Pierre Marraccini⁹, Alan Carvalho Andrade¹⁰

¹Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café

²Bolsista CAPES, Doutoranda, UFLA/SupAgro, Minas Gerais-MG/ Montpellier-FR, michellecotta@gmail.com

³Pesquisador, PhD, CIRAD UMR AGAP, Montpellier-FR, stephanie.sidibe-bocs@cirad.fr

⁴Bolsista Consórcio Pesquisa Café, BS, Universidade Paulista, Brasília-DF, embrapa.ecsr@gmail.com

⁵Bolsista CAPES, DsC, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, tatanaitase@gmail.com

⁶Bolsista CAPES, Doutoranda, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, saquinobiotec@gmail.com

⁷Bolsista CAPES, Doutoranda, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, fearca14@gmail.com

⁸Pesquisador, PhD, CIRAD UMR AGAP, Montpellier-FR, dominique.this@supagro.inra.fr

⁹Pesquisador PhD, CIRAD UMR AGAP, Brasília-DF, marraccini@cirad.fr

¹⁰Pesquisador PhD, Embrapa Café, Lavras-MG, alan.andrade@embrapa.br

RESUMO: O déficit hídrico e altas temperaturas são consequências atuais e diretas do aquecimento global e fatores-chave que afetam o desenvolvimento e a produtividade cafeeira. Apesar das complexas estratégias utilizadas por plantas perenes para adaptarem-se à seca, existe no gênero *Coffea* variabilidade genética que pode ser utilizada como ferramenta para potencializar a tolerância das plantas a esse estresse. O Ácido abscísico (ABA) é o hormônio central que regula a fisiologia da planta na resposta ao déficit hídrico. O objetivo do presente trabalho foi identificar e caracterizar os genes componentes do sistema tripartite (PYL-PP2C-SnRK2) de percepção e transdução de sinal de ABA em *Coffea canephora*. Clones tolerantes (14, 73 e 120) de *C. canephora* Conilon têm sido caracterizados como plantas vigorosas com alta produtividade durante anos em regime de escassez hídrica e apresentam-se como valiosos modelos de estudo. Receptores intracelulares (PYR/PYL/RCAR) envolvidos na percepção do sinal de ABA foram recentemente identificados em plantas. Um mecanismo de transdução de sinal de ABA foi proposto, envolvendo tais receptores interagindo com fosfatases do tipo PP2C e quinases SnRK2. Neste trabalho, as sequências proteicas de *Arabidopsis*, citros, arroz, uva, tomate foram escolhidos como query para a busca das respectivas sequências ortólogas de café em bancos de dados. Essa abordagem permitiu identificar 24 genes candidatos (9 PYL/RCAR, 6 PP2Cs e 9 SnRK2) no genoma de *C. canephora*. Os domínios protéicos específicos de cada família gênica foram verificados nas sequências aminoacídicas preditas o que permitiu caracterizá-las como receptores (PYR/PYL/RCAR), fosfatases (PP2C) ou quinases (SnRK2) da via de sinalização de ABA. Análises filogenéticas permitiram classificar as sequências polipeptídicas nas subclasses e subfamílias esperadas. As estruturas gênicas (éxons, íntrons e UTRs) foram funcionalmente anotadas no genoma de *C. canephora* (Coffea Genome Hub: <http://coffee-genome.org/>). Expressão diferencial foi observada *in silico* para esses genes nos órgãos (folha, semente, raiz e órgãos florais) de *C. canephora*. Em condições de déficit hídrico, dados de transcriptoma de raiz mostraram diferentes perfis de expressão entre os clones tolerantes (14, 73 e 120) e o sensível (22). Os resultados de qPCR evidenciaram perfis transcriptômicos diferenciais inclusive entre os clones tolerantes sugerindo a existência de múltiplos mecanismos biológicos para a tolerância à seca por meio da via dependente de ABA no cafeeiro. Outros resultados enfatizaram mecanismos comuns de indução gênica para todos os clones na condição não-irrigada. Tais informações podem ser úteis na identificação do determinismo genético da tolerância à seca no cafeeiro e para obtenção de marcadores moleculares visando auxiliar programas de melhoramento.

PALAVRAS-CHAVE: Déficit hídrico, ABA, PYR/PYL/RCAR, PP2C e SnRK2.

Water deficit and high temperatures are direct and actual consequences of global warming which as key-factors affect coffee development and production. Despite the complexity of strategies used by perennial plants to cope with drought, there is in *Coffea* genus genetic variability that can be used as a tool to enhance the plant tolerance to this stress. The abscisic acid (ABA) is the central hormone that regulates plant physiology in response to water deficit. The aim of this study was to identify and characterize the components genes of a tripartite system (PYL-PP2C-SnRK2) from *Coffea canephora* concerning ABA perception and signal transduction. Tolerant clones (14, 73 e 120) of *C. canephora* Conilon have been characterized as vigorous plants with high productivity during years without water and present themselves as valuable study models. Intracellular receptors (PYR/ PYL/ RCAR) involved in the perception of ABA signal have been identified recently in plants. An ABA signal transduction mechanism has been proposed, involving such receptors interacting with the PP2C phosphatases and SnRK2 kinases. In this work, protein sequences from *Arabidopsis*, citrus, rice, grapes, tomatoes and potatoes were chosen as query to search the coffee orthologous sequences in databases. This approach allows identify 24 candidate genes (9 PYL / RCAR, 6 and 9 PP2Cs SnRK2) in *C. canephora* genome. The specific protein domains of each gene family were localized at predicted amino acid sequences which allowed

characterize them as receptors (PYR/PYL/RCAR), phosphatases (PP2C) or kinases (SnRK2). Phylogenetic analyzes allowed to classify the polypeptide sequences in the expected subclasses and subfamilies. The gene structures (exons, introns and UTRs) were functionally annotated in *C. canephora* genome (Coffea Genome Hub: <http://coffee-genome.org/>). *In silico* differential expression was observed for these genes in *C. canephora* organs (leaves, seeds, roots and floral organs). Regarding drought conditions, root transcriptome data showed different expression profiles between the tolerant clones (14, 73 and 120) and the sensitive (22). qPCR results showed differential transcriptomic profiles between the tolerant suggesting the existence of multiple biological mechanisms for drought tolerance using ABA pathway in coffee. Other results emphasized common mechanisms among all clones in a non-irrigated condition. Such information may be useful to identify the genetic determinism of drought tolerance in coffee as well as to obtain molecular markers to speed-up breeding programs.

KEYWORDS: Drought, ABA, PYR/PYL/RCAR, PP2C and SnRK2.

INTRODUÇÃO

O déficit hídrico e as elevadas temperaturas são os principais fatores abióticos que afetam a produção cafeeira. Em áreas marginais, sem irrigação ou durante as estações secas há diminuição de até 80% da produção (DaMatta e Ramalho, 2006). Como consequência do aquecimento global, as regiões de cultivo podem também sofrer redistribuição geográfica. *Coffea arabica* e *C. canephora* são as duas espécies de maior importância econômica do gênero *Coffea*, e correspondem a 70% e 30% do mercado internacional, respectivamente. *C. arabica* é uma espécie alotetraplóide ($2n = 4x = 44$) originada a 1 milhão de anos a partir da hibridização natural de dois genomas ancestrais diplóides, *C. canephora* e *C. eugenioides* (Lashermes et al., 1999). *C. arabica* é uma espécie predominantemente autógama (auto fértil) o que explica sua baixa diversidade genética. Por fornecer uma bebida de alta qualidade, *C. arabica* é a espécie mais cultivada. Por outro lado, *C. canephora* é uma espécie diplóide ($2n = 2x = 22$) alógama que tem alta diversidade genética e habilidade para se adaptar as variações climáticas.

O ácido abscísico (ABA), descoberto na década de 1960 (Ohkuma et al., 1963) é um hormônio vegetal sintetizado nas raízes e folhas (Thompson et al., 2007) das plantas e age como regulador central que as protege de estresses abióticos como a seca (Soon et al., 2012). O ABA pode ser acumulado de 10 a 30 vezes nas plantas submetidas à estresse de seca em comparação à plantas não estressadas (Leung et al., 2012). Recentemente, dois grupos de pesquisa independentes descobriram novos receptores intracelulares de ABA (PYR/PYL/RCARs) em *Arabidopsis thaliana* envolvidos na detecção e sinalização do ABA via interação direta com proteínas fosfatases do tipo 2C (Ma et al., 2009; Park et al., 2009). O núcleo da via de sinalização de ABA contém a subfamília de PP2Cs e três quinases Snfl, SnRK2.2, SnRK2.3, SnRK2.6 (Umezawa et al., 2010) cujas atividades são controladas por ABA.

As respostas à seca dependente de ABA incluem o redirecionamento da expressão de genes, redução da transpiração, controle da fotossíntese e crescimento da planta. Ao longo das últimas décadas, grandes esforços têm focado em elucidar o mecanismo molecular que envolve a recepção da molécula de ABA e transdução do sinal (Umezawa et al., 2010). O atual modelo de percepção e transdução de sinal é descrito da seguinte forma (Figura 1): na ausência de ABA, as quinases SnRK2 são inativadas pelas proteínas fosfatases PP2Cs. Isso acontece porque as proteínas fosfatases PP2Cs interagem fisicamente como reguladores negativos das proteínas quinases SnRK2 e desfosforilam o resíduo de serina no loop de ativação das quinases. A desfosforilação é essencial para a atividade da proteína quinase à jusante na via de sinalização de ABA. Por outro lado, na presença de ABA, o hormônio se liga as proteínas receptoras PYR/PYL/RCAR e isso permite a ligação ao sítio catalítico das proteínas PP2Cs. Os receptores inativam a atividade enzimática das fosfatases. Desse modo, o ABA induz a inibição das PP2Cs o que leva a ativação das SnRK2 por ativação do loop de auto fosforilação (Leung, 2012).

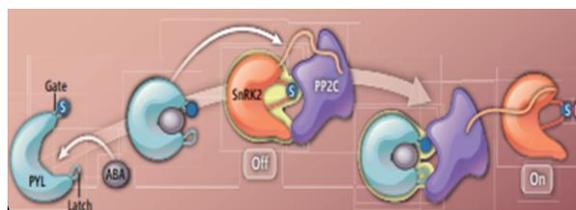


Figura 1. Mecanismo de percepção e transdução de sinal de ABA. Na ausência de estresse hídrico, a fosfatase PP2C inibe a atividade da quinase SnRK2 por desfosforilação e os genes de resposta a seca não são expressos. Na ausência das moléculas de ABA as proteínas receptoras (PYR/PYL/RCAR) possuem uma conformação aberta para as regiões denominadas 'Gate' e 'Latch'. Por outro lado, em uma situação de déficit hídrico, os níveis de ABA aumentam e a ligação do hormônio ao receptor induz o fechamento da região 'Gate' e 'Latch'. Uma nova superfície de interação na molécula receptora é criada permitindo a ligação à fosfatase PP2C o que consequentemente libera a quinase. Desse modo, os genes implicados na resposta da planta à seca são ativados pela atividade de SnRK2 (Adaptado de Leung et al., 2012).

As proteínas solúveis PYR/PYL/RCAR são membros da superfamília START de proteínas, recentemente denominada superfamília Bctv I-fold (Radauer et al., 2008). Em plantas, os ortólogos PYR/PYL/RCAR dos receptores de ABA parecem ser altamente conservados a nível evolutivo. A família de receptores pode ser classificada em diferentes subtipos baseado na similaridade de sequência, sensibilidade a ABA, estado oligomérico e nível de atividade basal.

As proteínas fosfatases são bem conhecidas por estarem envolvidas na sinalização de ABA. As proteínas PP2Cs são classificadas de acordo com a especificidade do substrato em Ser/Thr, Tyr e de dupla-especificidade. Dependendo das características bioquímicas e estruturais, as fosfatases Ser/Thr de planta são principalmente classificadas nos grupos PP1, PP2A e PP2C. Membros de PP2Cs do grupo A tem se mostrado envolvidos na sinalização de ABA (Ben-Ari, 2012).

A fosforilação reversível de proteínas é um mecanismo fundamental pelo qual os organismos modulam eventos de transdução de sinal. SnRK2 ativa pode fosforilar os efetores à jusante tais como fatores transcricionais (zíper de leucina ABFs/AREBs, por exemplo) regulando a transcrição de genes responsivos à ABA (Furuihata et al., 2006). O primeiro gene regulador positivo denominado SnRK2 (“*Subfamily 2 of sucrose non-fermenting 1 related protein kinases SNF1*”) foi isolado e caracterizado em trigo e nomeado PKABA1 (Anderberg & Walker-Simmons 1992). O genoma de *A. thaliana* codifica 10 SnRK2 dentre as quais SnRK2.6, Snrk2.2 e SnRK2.3 tem sido associadas à sinalização de ABA. A região C-terminal de SnRK2.2, SnRK2.3 e SnRK2.6 contém domínio rico em Asp requerido tanto para a ativação específica da quinase como para a interação com a PP2C (Hubbard et al., 2010).

Nos últimos anos, grandes esforços têm sido implementados nos estudos de genômica para tentar entender o determinismo genético da tolerância a estresses ambientais, bióticos e abióticos, especialmente em espécies modelos. O mesmo se aplica ao caso do cafeeiro em que os recentes progressos no sequenciamento do genoma resultaram em milhares de seqüências EST (Mondego et al., 2011), para a construção de mapas genéticos (Leroy et al., 2011), melhoria das técnicas de transformação genética (Ribas et al., 2011) e sequenciamento do genoma completo (Denoëud et al., 2014). Estudo recente com genótipos contrastantes de *C. canephora* para a tolerância a seca revelou que dentre os genes de resposta analisados houve diferentes perfis de expressão para os genes PYLs (Marraccini et al., 2012; Vieira et al., 2013), o que pode evidenciar a existência de diferentes mecanismos envolvidos na tolerância à seca por meio da via de resposta dependente de ABA no cafeeiro. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi identificar e caracterizar os genes ortólogos do sistema tripartite PYR/PYL/RCAR-PP2C-SnRK2 em *Coffea* sp.

MATERIAL E MÉTODOS

No intuito de isolar os ortólogos PYR/PYL/RCAR-PP2C-SnRK2 de *C. canephora*, inicialmente, buscas foram feitas em bancos de dados de sequências públicas por meio dos números identificadores dos genes (ID), pré-selecionados na literatura, para a seleção das seqüências query das espécies de interesse: *A. thaliana*, *S. lycopersicum*, *V. vinifera*, *C. sinensis* e *O. sativa*. Os seguintes bancos foram consultados: NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>), AtGDB (<http://www.plantgdb.org/AtGDB/>), Phytozome (<http://www.phytozome.net/>), Sol Genomics Network (<http://solgenomics.net/>), SIGDB (<http://www.plantgdb.org/SIGDB/>), GreenPhyl (<http://www.phytozome.net/>), The Grape Genome Database (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/>), Gramene (<http://www.gramene.org/>), Plant Genome Database (<http://www.plantgdb.org/>), Citrus Genome Database (<http://www.citrusgenomedb.org/>) e Rice Genome Annotation (<http://rice.plantbiology.msu.edu>). Busca por BLAST foi feita no Coffee Genome Hub (<http://www.coffee-genome.org/>) e no banco ESTs Rubiaceae (e-value < e^{-10}) do NCBI usando as seqüências query previamente identificadas e selecionadas. Para cada família analisada, as seqüências identificadas em café foram traduzidas, e alinhadas às seqüências proteicas das outras espécies usando o programa de alinhamento MAFFT (Katoh & Toh, 2008) disponível na plataforma South Green Bioinformatics Platform (SGBP - <http://southgreen.cirad.fr>), na interface Galaxy (Giardine et al., 2005). Os motivos e resíduos aminoacídicos conservados e característicos das famílias estudadas foram destacados por meio do programa GeneDoc (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>). Os genes que não continham os domínios específicos foram retirados das análises. Em seguida, as seqüências foram filtradas pelo programa GBlock (Castresana, 2000) para a construção da árvore filogenética por meio do algoritmo PhyML (Guindon et al., 2010). Utilizou-se como referência a árvore das espécies disponível no Banco de Taxonomia do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=taxonomy>). Para a reconciliação da árvore gênica com a árvore das espécies o algoritmo RAP-Green (Dufayard et al., 2005) foi utilizado.



Figura 2. Seqüências protéicas de *Arabidopsis*, citros, arroz, uva, e tomate foram escolhidos como query para a busca de genes ortólogos em café. Com esse propósito, as ferramentas e bancos de dados ilustrados acima foram utilizados.

RESULTADOS

No genoma de *C. canephora*, 9 genes que codificam proteínas homólogas as proteínas de *Arabidopsis*, citros, arroz, uva e tomate foram encontrados para os receptores de ABA. Para avaliar o grau de conservação evolutivo dessas proteínas entre as espécies, bem como verificar os motivos característicos da família PYR/PYL/RCAR, as seqüências aminoacídicas foram alinhadas (Figura 3) e o domínio START foi comparado. Em geral, as seqüências são altamente conservadas entre as espécies. As regiões de "latch" e "gate" das proteínas de *C. canephora* evidenciam os domínios funcionais. Avaliação similar foi realizada com as proteínas PP2Cs e SnRK2 e foi possível identificar 6 e 9 seqüências para as fosfatase PP2Cs e quinases SnRK2 específicas de ABA em *C. canephora*. O comprimento das seqüências PYLs, PP2Cs, SnRK2s são 173-231, 417-545 e 129-363, respectivamente.

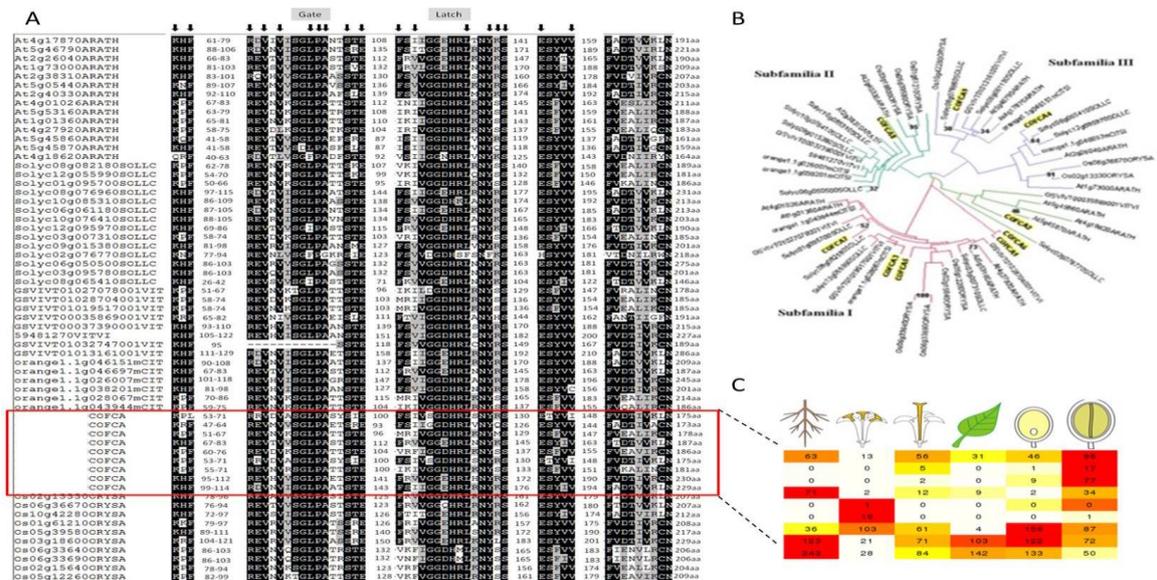


Figura 3. Caracterização dos receptores de ABA de *C. canephora* (CcPYLs). A: Alinhamento das sequencias proteicas preditas dos genes PYR/PYL/RCAR. As seqüências aminoacídicas são mostradas apenas na região dos resíduos e domínios funcionais. As posições dos resíduos nas seqüências estão marcadas próximas aos motivos. Os comprimentos das seqüências de aminoácidos estão indicados à direita. Os resíduos funcionais e domínios conservados estão marcados em preto ou cinza e foram baseados nos trabalho de Melcher et al.,2009 e Sun et al., 2011. Os resíduos que fazem a ligação do receptor à molécula de ABA estão indicados com as setas pretas. Os domínios 'gate' e 'latch' estão identificados. ARATH: *A. thaliana*; SOLLC: *S. lycopersicum*; VITVI: *V. vinifera*; CITSI: *C. sinensis*; COFCA: *C. canephora*; ORYSA: *O. sativa*. B: Análise filogenética dos receptores de ABA em *C. canephora*. Subfamílias I (vermelho), II (verde) e III (azul). C: Heatmap dos genes que codificam para os receptores de ABA nos órgãos e tecidos de *C. canephora*: raízes, estame, pistilo, folha e perisperma (jovem) e endosperma (maduro). Os dados de expressão foram normalizados por RPKM. A expressão dos genes é indicada por meio de um espectro de cor: pouca expressão (branco), mediana (amarelo) e alta (vermelho).

Por meio das análises de anotação funcional, foi possível observar que a estrutura final de quatro genes pertencentes à família PYR-PYL-RCAR não apresentou íntrons (Figura 4), enquanto, a estrutura dos demais 5 genes apresentaram um ou dois íntrons nas regiões codantes. Essa ocorrência de íntrons (0-2) corrobora com resultados anteriores para os receptores de ABA identificados em outras espécies (*A. thaliana*, *S. lycopersicum*, *V. vinifera*, *C. sinensis* e *O. sativa*).

Em relação às regiões UTR, foi possível identificar um íntron na região 5'UTR de um único gene da família PYR-PYL-RCAR em *C. canephora*.

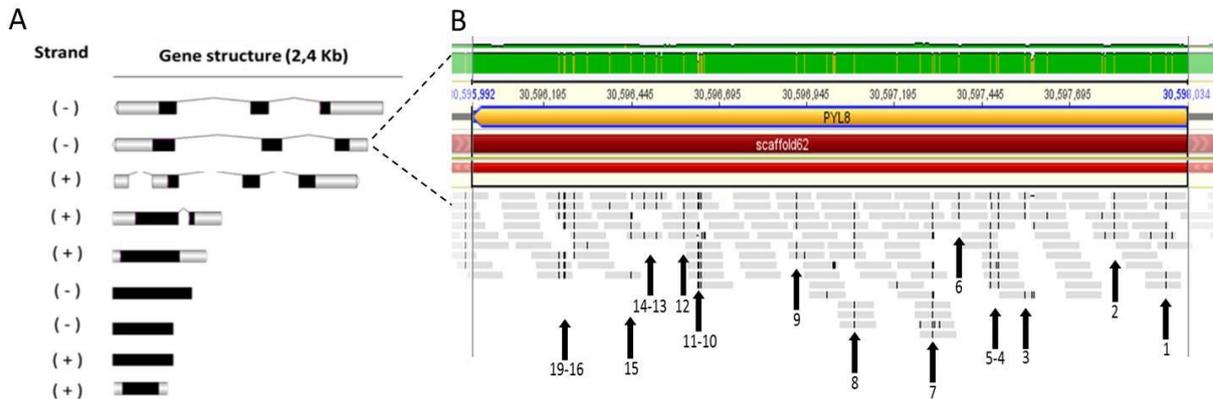


Figura 4. Estrutura gênica dos receptores de ABA e identificação de polimorfismos. Os éxons, íntrons e UTRs de cada dos genes PYR-PYL-RCAR de *C. canephora* foram identificados e anotados no genoma de referência. B: Identificação de polimorfismos ao comparar a região codante do gene *CcPYL8* do clone tolerante 14 à sequência do mesmo gene no genoma de referência.

Os resultados de qPCR evidenciaram indução de expressão para vários genes das três famílias gênicas na condição de déficit hídrico. É possível, por exemplo, verificar o perfil diferencial de expressão da fosfatase *CcPP2C* entre os órgãos analisados (folha e raiz) e entre os clones tolerantes (14, 73 e 120).

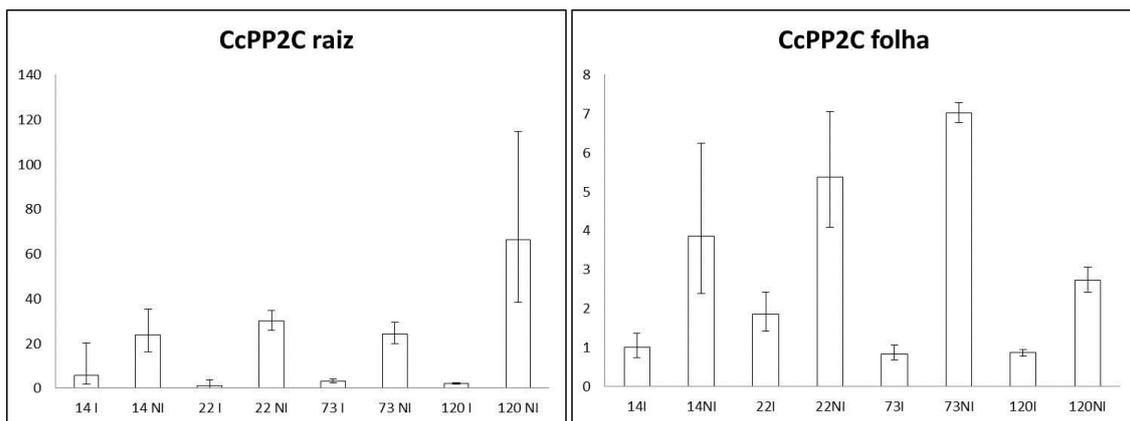


Figura 5. Expressão do gene *CcPP2C* da via de sinalização de ABA. A expressão do gene *CcPP2C* codificando para a fosfatase foi testada nas raízes e nas folhas dos clones de *C. canephora* Conilon tolerantes a seca (14, 73 e 120) e o clone 22 sensível a seca cultivados em condição irrigada (I) ou não irrigada (NI). Os resultados de qPCR são expressos em quantificação relativa normalizada com a expressão do gene endógeno (referência) *CcUBQ10*. Para cada ensaio, os níveis de expressão obtidos com a amostra 14I foram usados como o calibrador interno.

CONCLUSÕES

- 1- O sistema de recepção e transdução de sinal de ABA em *C. canephora* é formado por 24 genes candidatos, sendo 9 genes receptores PYR/PYL/RCAR, 6 fosfatases PP2Cs e 9 quinases SnRK2s;
- 2- Os motivos protéicos identificados e conservados permitem caracterizar os genes do cafeeiro como membros das famílias de receptores (PYR/PYL/RCAR), fosfatases (PP2Cs) ou quinases (SnRK2) da via de resposta a ABA;
- 3- As análises filogenéticas permitiram classificar os genes dentre as clades, subfamílias e subclasses características das famílias gênicas estudadas;
- 4- Os 24 genes do sistema tripartite de resposta a ABA apresentam perfis de expressão diferencial *in silico* nos órgãos (raízes ou folhas) avaliados e entre os diferentes genótipos;
- 5- De maneira geral, os genes das três famílias apresentaram níveis de expressão mais altos nas raízes que nas folhas de acordo com os resultados observado *in vivo* por qPCR. Além disso, independente do tecido analisado, a expressão da maioria dos genes foi induzida na condição de déficit hídrico.

AGRADECIMENTOS

Ao programa CAPES-COFECUB pelo apoio financeiro e ao Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) pelo provimento dos clones de *C. canephora* utilizados neste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERBERG, R.J.; WALKER-SIMMONS, M.K. (1992). Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid-inducible transcript with homology to protein kinases. *Proc Nat Acad Sci*. 89, 10183-10187.
- BEN-ARI, G. (2012). The ABA signal transduction mechanism in commercial crops: learning from *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep* 31, 1357-1369.
- CASTRESANA, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 17, 540-552.
- DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J.D.C. (2006). Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. *Braz. J. Plant Physiol.* 18, 55-81.
- DENOEUDE F, CARRETERO-PAULET L, DEREPPER A, DROC G, GUYOT R, PIETRELLA M, ZHENG C, ALBERTI A, ANTHONY F, APREA G, AURY J-M, BENTO P, BERNARD M, BOCS S, CAMPA C, CENCI A, COMBES M-C, CROUZILLAT D, DA SILVA C, DADDIEGO L, DE BELLIS F, DUSSERT S, GARSMEUR O, GAYRAUD T, GUIGNON V, JAHN K, JAMILLOUX V, JOËT T, LABADIE K, LAN T, LECLERCQ J, LEPELLEY M, LEROY T, LI L-T, LIBRADO P, LOPEZ L, MUÑOZ A, NOEL B, PALLAVICINI A, PERROTTA G, PONCET V, POT D, PRIYONO, RIGOREAU M, ROUARD M, ROZAS J, TRANCHANT-DUBREUI C, VANBUREN R, ZHANG Q, ANDRADE A.C, ARGOUT X, BERTRAND B, DE KOCHKO A, GRAZIOSI, HENRY R.J, JAYARAMA, MING R, NAGAI C, ROUNSLEY S, SANKOFF D, GIULIANO G, ALBERT V.A, WINCKER P, LASHERMES P. (2014). The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. *Science* 345, 1181-1184.
- DUFAYARD, J.F.; DURET, L.; PENEL, S.; GOUY, M.; RECHENMANN, F.; PERRIERE, G. (2005). Tree pattern matching in phylogenetic trees: automatic search for orthologous or paralogs in homologous gene sequence databases. *Bioinformatics* 21, 2596-2603.
- GIARDINE, B.; RIEMER, C.; HARDISON, R.C.; BURHANS, R.; ELNITSKI, L.; SHAH, P.; ZHANG, Y.; BLANKENBERG, D.; ALBERT, I.; TAYLOR, J.; MILLER, W.; KENT, W.J.; NEKRUTENKO, A. (2005). Galaxy: A platform for interactive large-scale genome analysis. *Genome Res.* 15, 1451-1455.
- GUINDON, S.; DUFAYARD, J.F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDIJK, W.; GASCUEL, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307-321.
- HUBBARD, K.E.; NISHIMURA, N.; HITOMI, K.; GETZOFF, E.D.; SCHROEDER, J.I. (2010). Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes Dev* 24, 1695-1708.
- KATOH, K.; TOH, H. (2008). Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Brief Bioinform.* 9, 286-298.
- LASHERMES, P.; COMBES, M.C.; ROBERT, J.; TROUSLOT, P.; D'HONT, A.; ANTHONY, F.; CHARRIER, A. (1999). Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Mol Gen Genet* 261, 259-266.
- LEROY, T.; DE BELLIS, F.; LEGNATE, H.; KANAMURA, E.; GONZALES, G.; PEREIRA, L.F.; ANDRADE, A.C.; CHARMETANT, P.; MONTAGNON, C.; CUBRY, P.; MARRACCINI, P.; POT, D.; DE KOCHKO, A. (2011). Improving quality of African Robustas: QTL for agronomic and quality related traits in *Coffea canephora*. *Tree Genet Genomes*. doi:10.1007/s11295-011-0374-6
- LEUNG, J.; VALON, C.; MOREAU, B.; BOEGLIN, M.; LEFOULON, C.; JOSHI-SAHA, A.; CHEREL, I. (2012). Mécanisme moléculaire d'action de l'acide abscissique en réponse à la sécheresse chez les végétaux - The ABC of abscisic acid action in plant drought stress responses. *Biologie Aujourd'hui*. 206, 301-312.
- MA, Y.; SZOSTKIEWICZ, I.; KORTE, A.; MOES, D.; YANG, Y.; CHRISTMANN, A.; GRILL, E. (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science*. 324, 1064-68.
- MARRACCINI, P.; VINECKY, F.; ALVES, G.S.C.; RAMOS, H.J.O.; ELBELT, S.; VIEIRA, N.G.; CARNEIRO, F.A.; SUJI, P.S.; ALEKCEVETCH, J.C.; SILVA, V.A.; DAMATTA, F.M.; FERRÃO, M.A.G.; LEROY, T.; POT, D.; VIEIRA, L.G.E.; DA SILVA, F.R.; ANDRADE, A.C. (2012). Differentially expressed genes and proteins upon drought acclimation in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. *J Exp Bot.* 63, 4191-4212.
- MELCHER, K.; NG, L-M.; ZHOU, X.E.; SOON, F-F.; XU, Y.; SUINO-POWELL, K.M.; PARK, S-Y.; WEINER, J.J.; FUJII, H.; CHINNUSAMY, V.; KOVACH, A.; LI, J.; WANG, Y.; LI, J.; PETERSON, F.C.; JENSEN, D.R.; YONG, E-L.; VOLKMAN, B.F.; CUTLER, S.R.; ZHU, J-K.; XU, H.E. (2009). A gate-latch-lock mechanism for signal transduction by abscisic acid receptor. *Nature* 462, 602-68.
- MONDEGO, J.M.C.; VIDAL, R. O.; CARAZZOLLE, M.F.; TOKUDA, E.K.; PARIZZI, L.P.; COSTA, G.G.L.; PEREIRA, L.F.P.; ANDRADE, A.C.; COLOMBO, C.A.; VIEIRA, L.G.E.; PEREIRA, G.A.G. (2011). An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. *BMC Plant Biol* 11, 30.
- OHKUMA, K.; LYON, J.L.; ADDICOTT, F.T.; SMITH, O.E. (1963). Abscisin II, an abscission-accelerating substance from young cotton fruit. *Science* 142:1592-93.
- PARK, S.Y.; FUNG, P.; NISHIMURA, N.; JENSEN, D.R.; FUJII, H.; ZHAO, Y.; LUMBA, S.; SANTIAGO, J.; RODRIGUES, A.; CHOW, T.F.; ALFRED, S.E.; BONETTA, D.; FINKELSTEIN, R.; PROVART, N.J.; DESVEAUX, D.; RODRIGUEZ, P.L.; MCCOURT, P.; ZHU, J.K.; SCHROEDER, J.I.; VOLKMAN, B.F.; CUTLER, S.R. (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324,1068-1071.
- RADAUER, C.; LACKNER, P.; BREITENEDER, H. (2008). The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. *BMC Evol. Biol.* 8, 1-19.
- RIBAS, A.F.; DECHAMP, E.; CHAMPION, A.; BERTRAND, B.; COMBES, M.C.; VERDEIL, J.L.; LAPEYRE, F.; LASHERMES, P.; ETIENNE, H. (2011). Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Coffea arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. *BMC Plant Biol* 11, 92.
- SOON, F.F.; NG, L.M.; ZHOU, X.E.; WEST, G.M.; KOVACH, A.; TAN, M.H.; SUINO-POWELL, K.M.; HE, Y.; XU, Y.; CHALMERS, M.J.; BRUNZELLE, J.S.; ZHANG, H.; YANG, H.; JIANG, H.; LI, J.; YONG, E.L.; CUTLER, S.; ZHU, J.K.; GRIFFIN, P.R.; MELCHER, K.; XU, H.E. (2012). Molecular mimicry regulates ABA signaling by SnRK2 kinases and PP2C phosphatases. 335, 85-88.
- SUN, L.; WANG, Y-P.; CHEN, P.; REN, J.; JI, K.; LI, Q.; LI, P.; DAI, S-J.; LENG, P. (2011). Transcriptional regulation of *SIPYL*, *SIPP2C*, and *SlSnRK2* gene families encoding ABA signal core components during tomato fruit development and drought stress. *J Exp Bot* 62:5659-5669.
- THOMPSON, A.J.; MULHOLLAND, B.J.; JACKSON, A.C.; MCKEE, J.M.; HILTON, H.W.; SYMONDS, R.C.; SONNEVELD, T.; BURBIDGE, A.; STEVENSON, P.; TAYLOR, I.B. (2007). Regulation and manipulation of ABA biosynthesis in roots. *Plant Cell Environ* 30, 67-78.
- UMEZAWA, T.; NAKASHIMA, K.; MIYAKAWA, T.; KUROMORI, T.; TANOKURA, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. (2010). Molecular basis of the core regulatory network in ABA responses: sensing, signaling and transport. *Plant Cell Physiol.* 51, 1821-1839.
- VIEIRA, N.V.; CARNEIRO, F.A.; SUJII, P.S.; ALEKCEVETCH, J.C.; FREIRE, L.P.; VINECKY, F.; ELBELT, S.; SILVA, V.A.; DAMATTA, F.M.; FERRÃO, M.A.G.; MARRACCINI, P.; ANDRADE, A.C. (2013). Different molecular mechanisms Account for drought tolerance in *Coffea canephora* var. Conilon. *Tropical Plant Biol.* 6, 181-190.