

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À RECEPÇÃO E TRANSDUÇÃO DO SINAL DE ABA EM *COFFEA* SP¹

Michelle Guitton Cotta², Pierre Marraccini^{3,5}, Dominique This³, Thierry Leroy³, Stéphanie Bocs³, Alexis Dereeper⁴, Philippe Lashermes⁴, Alan Carvalho Andrade⁵

¹Trabalho financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (projeto CAPES-COFECUB n° 0407/2012)

²Doutoranda, Universidade Federal de Lavras, UFLA - Lavras, MG/ Centre International d'Etudes Supérieures en Sciences Agronomiques – SupAgro, Montpellier – FR, michellegcotta@gmail.com

³Pesquisador, PhD, CIRAD UMR AGAP, Montpellier – FR

⁴Pesquisador, PhD, CIRAD UMR RPB, Montpellier – FR

⁵Pesquisador, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF

RESUMO: O gênero *Coffea* representa a principal commodity agrícola do mundo. Atualmente, o déficit hídrico e as elevadas temperaturas são os principais fatores abióticos responsáveis pelo declínio na produção. Tais variações ambientais também influenciam a composição bioquímica de grãos e afetam diretamente a qualidade da bebida. A variabilidade genética natural presente no gênero *Coffea* pode ser usada para aumentar a tolerância à seca e gerar variedades cafeeiras melhor adaptadas às variações climáticas. O ácido abscísico (ABA) é um hormônio vegetal que age como regulador central na resposta das plantas ao déficit hídrico. Recentemente, novos receptores intracelulares de ABA (PYR/PYL/RCARs) envolvidos na detecção e sinalização desse hormônio têm sido identificados e caracterizados em diversas espécies de plantas. O mecanismo de transdução de sinal de ABA proposto envolve os receptores PYR/PYL/RCARs que interagem com as proteínas fosfatases (PP2Cs) e quinases (SnRK2s). O objetivo do presente trabalho foi identificar e caracterizar os genes ortólogos desse sistema tripartite em *Coffea* sp. Para isso, as sequências protéicas de *Arabidopsis*, citros, arroz, uva e tomate foram selecionadas como sequências-alvo para a busca dos genes de café em bancos de sequências. 51 sequências das proteínas PYR/PYL/RCAR oriundas dessas espécies modelo permitiram identificar 9 sequências de receptores do ABA em *Coffea* sp. Do mesmo modo, 40 e 29 sequências permitiram identificar 6 e 9 sequências ortólogas das proteínas PP2Cs e SnRK2, respectivamente, em *Coffea* sp. Os 24 genes isolados que compõem o sistema tripartite da via de resposta a ABA em café apresentam expressão *in silico* diferencial em tecidos como folhas, sementes, raízes e órgãos florais. Polimorfismos foram encontrados entre os genes ortólogos e homólogos. No genoma de *C. arabica* foi possível identificar variações na sequência dos dois subgenomas diplóides ancestrais, *C. canephora* (CaCc) e *C. eugenioides* (CaCe). Análises futuras permitirão prever o efeito funcional desses polimorfismos nas estruturas protéicas em diferentes espécies do cafeeiro. Todas essas evidências são essenciais para elucidar o determinismo genético de tolerância à seca bem como contribuir para a obtenção de marcadores moleculares que poderão ser usados em programas de melhoramento.

PALAVRAS-CHAVE: *Coffea* sp., Ácido abscísico, PYR/PYL/RCAR, PP2C, SnRK2, déficit hídrico.

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GENES INVOLVED IN THE RECOGNITION OF THE ABA AND THE SIGNAL TRANSDUCTION IN *COFFEA* SP

ABSTRACT: *Coffea* genus represents a major agricultural commodity in world trade. Nowadays, drought and elevated temperatures are the major climatic limitations for coffee production. These variations also influence biochemical composition of beans and affecting directly the final cup quality. There is genetic variability within the *Coffea* genus that could be used to increase drought tolerance and generate coffee varieties better adapted to climatic variations. Abscisic Acid (ABA) is a vital plant hormone acting as central regulator that protects plants against abiotic stresses such as drought. Recently, novel intracellular ABA receptors (PYL/RCARs) involved in ABA sensing and signalling has been identified in several species. A mechanism of ABA transduction has been proposed, evolving PYR/PYL/RCARs receptors interacting with PP2Cs phosphatases and SnRK2 protein kinases. The goal of this study was to identify and characterize orthologs genes of this tripartite system in *Coffea* sp. For this purpose, protein sequences from *Arabidopsis*, citrus, rice, grape, and tomato were chosen as query to search orthologs genes in coffee in sequence databank. Using 51 PYR/PYL/RCAR sequences from those model species allowed to identify 9 sequences for ABA receptors in coffee. Likewise, the 40 and 29 sequences query allowed to identify 6 and 9 sequences PP2Cs and SnRK2 specific to ABA in *Coffea* sp. The 24 genes isolated that belong to the tripartite system of the coffee's ABA pathway show *in silico* differential expression in tissues as leaves, seeds, roots and floral organs. Polymorphisms were found among the orthologs and homeologs genes. All analyses allow the identification in *C. arabica* genome the sequences variations between the two ancestral diploid subgenomes, *C. canephora* (CaCc) and *C. eugenioides* (CaCe). Further analyses will predict the functional effect of those polymorphisms in protein structure in different coffee

species. All these evidences will help to identify the genetic determinism of drought tolerance essential to obtain molecular markers that could be used in coffee breeding programs.

KEYWORDS: *Coffea* sp., Abscisic acid, PYR/PYL/RCAR, PP2C, SnRK2, drought.

INTRODUÇÃO

O gênero *Coffea* pertence à família das Rubiáceas, a quarta maior família de plantas com flores do planeta. Estudos recentes mostram que 10 a 20% do total da diversidade de espécies de plantas é representada por esta família. O gênero de maior valor econômico é o gênero *Coffea* o qual representa a principal *commodity* agrícola no comércio mundial. Atualmente, o gênero *Coffea* contém 124 espécies perenes nativas da África, Ásia, Austrália, Madagascar, ilhas Mascarenhas e Comores (Davis *et al.*, 2011). *Coffea arabica* e *C. canephora* são as duas espécies de maior importância econômica do gênero 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 (Hatanaka *et al.*, 1999). 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, tem alta diversidade genética e habilidade para se adaptar as variações climáticas. Entretanto, essa espécie produz uma bebida de menor qualidade, mais adequada à produção de café instantâneo (Hatanaka *et al.*, 1999).

Atualmente, a produção mundial é de 144 milhões de sacas (60 Kg) de grãos de café e o Brasil é o maior produtor (35%). 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 isso pode levar a uma diminuição da produção em até 80% (DaMatta e Ramalho, 2006). Como consequência do aquecimento global, as regiões de cultivo podem também sofrer redistribuição geográfica. Variações na temperatura e pluviometria também influenciam a composição bioquímica dos grãos (Mazzafra, 2007) e consequentemente afetam a bebida final. Há variabilidade genética no gênero *Coffea* que pode ser usada para aumentar a tolerância ao déficit hídrico e gerar variedades cafeeiras melhor adaptadas às variações climáticas, e isso tem se tornado uma das prioridades de muitos institutos de pesquisa de café (Marraccini *et al.*, 2012).

O ácido abscísico (ABA), descoberto na década de 1960 (Ohkuma *et al.*, 1963; Cornforth 1965) 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 hídrico em comparação à plantas não estressadas (Leung *et al.*, 2012). As respostas de ABA incluem o redirecionamento da expressão de genes, redução da transpiração, controle da fotossíntese e crescimento da planta. Ao longo das últimas décadas, um grande esforço tem focado em elucidar o mecanismo molecular que envolve a recepção da molécula de ABA e sinalização (Umezawa *et al.*, 2010). 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. O atual modelo de transdução de sinal é descrito da seguinte forma (Figura 1A, B): 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).

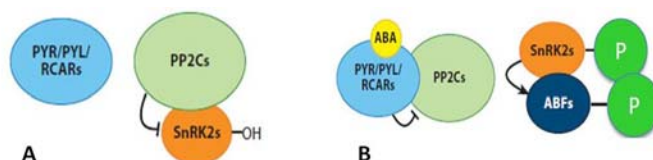


Figura 1: Mecanismo de transdução de sinal de ABA. A: Na ausência de estresse hídrico, a fosfatase PP2C inibe a atividade da quinase SnRK2 por desfosforilação e os genes de resposta não são expressos. B: Em situação de estresse hídrico, os receptores de ABA (PYR/PYL/RCAR) se ligam a fosfatase PP2C inativando-a e consequentemente os genes implicados na resposta da planta ao estresse são ativados pela atividade quinase de SnRK2 (Cutler *et al.*, 2009).

As proteínas solúveis PYR/PYL/RCAR são membros da superfamília START de proteínas, recentemente denominada superfamília Bctv I-fold (Radauer *et al.*, 2008). Após a identificação genética e bioquímica dos receptores de ABA, as

estruturas químicas do complexo entre PYR/PYL/RCARs e PP2Cs foram determinadas via cristalografia de raio-X (Melcher *et al.*, 2009) (Figura 2). 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.

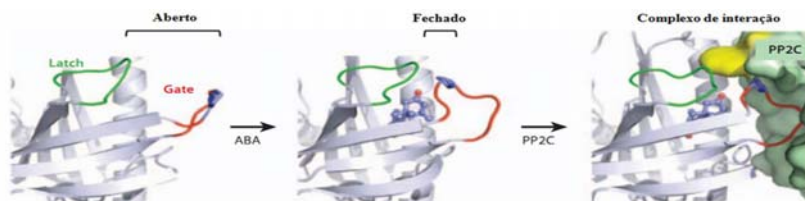


Figura 2: O ácido abscísico induz mudanças na conformação do receptor. Na ausência do ABA as proteínas receptoras (PYR/PYL/RCAR) possuem uma conformação aberta para as regiões denominadas 'Gate' e 'Latch' que flanqueiam a ligação da molécula de ABA. A ligação do ABA induz o fechamento do 'Gate' e 'Latch' o que cria uma superfície de interação na molécula receptora permitindo a ligação à fosfatase PP2C e consequente ativação da quinase (adaptado de Cutler *et al.*, 2010)

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 embora recentemente dois membros homólogos da clade de PP2CB foram também evidenciados por estar 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 (Furihata *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 20 anos atrás em trigo e nomeado PKABA1 (Anderberg e 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 resultou 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 (De Kochko *et al.*, 2010). Estudo recente com genótipos contrastantes de *C. canephora* para a tolerância ao estresse hídrico 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 na 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 *Coffea* sp., 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 Database (artigo em preparação) 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 (Kato e 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.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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. A fim de avaliar o grau de conservação evolutivo dessas proteínas entre as espécies, bem como verificar os motivos característicos da família PYR/PYL/RCAR, as sequências aminoacídicas foram alinhadas (Figura 3) e o domínio START foi comparado. Em geral, as sequências 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 sequências para as fosfatase PP2Cs e quinases SnRK2 específicas de ABA em *C. canephora*. O comprimento das sequências PYLs, PP2Cs, SnRK2s são 173-231, 417-545 e 129-363, respectivamente.

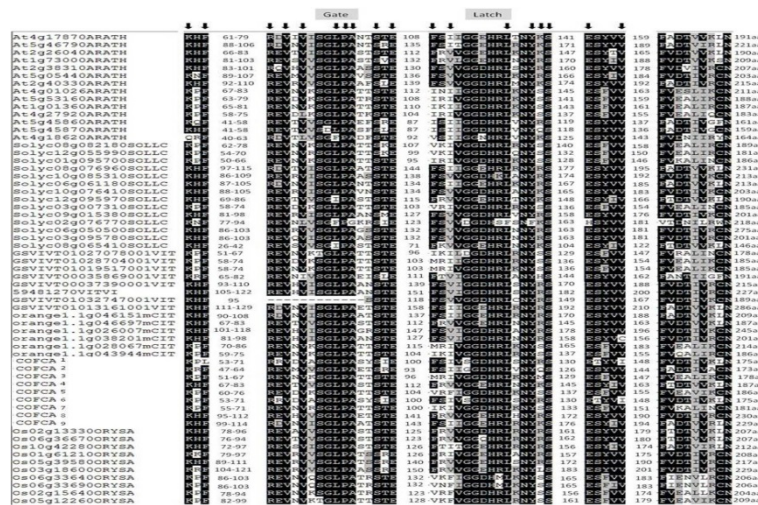


Figura 3: Alinhamento das proteínas PYR/PYL/RCAR. As sequências aminoacídicas são mostradas apenas na região dos resíduos e domínios funcionais. As posições dos resíduos nas sequências estão marcadas próximas aos motivos. Os comprimentos das sequências de aminoácidos estão indicados à direita. Os resíduos funcionais e domínios conservados estão marcados em preto ou cinza (Melcher *et al.*, 2009; 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 nomeados. ARATH: *A. thaliana*; SOLLIC: *S. lycopersicum*; VITVI: *V. vinifera*; CITSI: *C. sinensis*; COFCA: *C. canephora*; ORYSA: *O. sativa*.

As análises filogenéticas mostraram que as 9 sequências PYR/PYL/RCAR de *C. canephora* foram distribuídas nas três principais subfamílias (Ma *et al.*, 2009). A subfamília I (Figura 4A) é composta por cinco proteínas de *C. canephora* (COFCA 1, 3, 5, 6 e 7) e as proteínas de *A. thaliana* PYL7-10 (At4g01026, At5g53160, At1g01360 e At4g27920). A subfamília II por duas proteína de *C. canephora* (COFCA 2 e 8) agrupadas com as proteínas AtPYL 4-6 e 11-13 (At2g38310, At5g05440, At2g40330, At5g45860, At5g45870, At4g18620). A subfamília III apresenta as proteínas COFCA 4 e 9 assim como as AtPYR1(At4g17870) e AtPYL1-3 (At5g46790, At2g26040, At1g73000). Essas três subfamílias foram também encontradas nas análises filogenéticas realizadas em tomate e *Arabidopsis* (Sun *et al.*, 2011). As PP2Cs da via de sinalização de ABA (Figura 4B) incluem as fosfatases insensíveis a ABA 1 (ABI1 e ABI2), as fosfatases de resposta hiper sensível a germinação 1 (AHG1, AHG3) e hiper sensíveis a ABA1 (HAB1 e HAB2). No primeiro grupo identificou-se a proteína COFCA 10, no segundo as COFCA 11, 12 e 15 e no terceiro as proteínas COFCA 13 e 14, respectivamente. As proteínas quinases SnRK2 da via de ABA (Figura 4C) são classificadas em três subclasses. A subclasse I é formada pelas quinases que não são ativadas por ABA enquanto as subclasses 2 e 3 são. A subclasse 3 inclui as SnRK2.2, 2.3 e 2.6 as quais são consideradas as principais reguladoras da resposta de ABA. Dentre as SnRK2 da via ABA-dependente foram encontradas 9 proteínas em *C. canephora*, duas da subclasse I (COFCA 16 e 20), três na subclasse II (COFCA, 21, 22 e 24) e duas na subclasse III (COFCA 19 e 23).

Os genes COFCA 3, 7 e 8 são os receptores que apresentam maiores níveis de expressão (moderadamente alta) (Figura 5). Em *A. thaliana* por sua vez, os transcritos mais expressos são os AtPYR1 (At4g17870) e AtPYL1 (At5g46790) quando diferentes tecidos foram analisados (Gonzalez-Guzman *et al.*, 2012). Curiosamente, tanto os genes PYR1 e PYL1 de *A. thaliana* como os genes COFCA 3 e 7 de *C. canephora* estão inseridos na mesma clade (subfamília III) de acordo com as análises filogenéticas. Este resultado pode evidenciar mecanismo de conservação funcional dessas proteínas ao longo da evolução. No presente trabalho, o gene COFCA 7 é o melhor candidato para expressão em folha (141.6) e raiz (242.9). O mesmo gene foi analisado por meio de ensaio de qPCR em folhas de genótipos contrastantes de *C. canephora* e foi verificada uma resposta diferencial de expressão deste gene entre os genótipos sensível e tolerante ao estresse hídrico (Marraccini *et al.*, 2012). O gene COFCA 8 se destaca pela maior expressão em semente (perisperma, 155.5). COFCA 1, 4 e 6, por sua vez, são os candidatos à menor expressão e COFCA 5 e 9 mostram níveis de expressão moderados nos tecidos analisados.

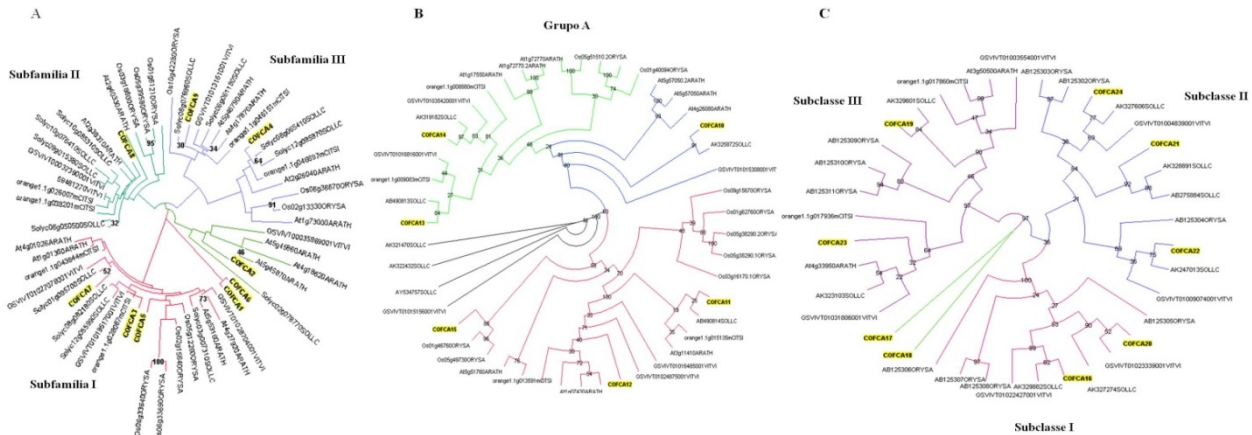


Figura 4: Análise filogenética das proteínas ortólogas do sistema tripartite PYR/PYL/RCAR-PP2C-SnRK2 de resposta a ABA em *C. canephora*. A: Receptores PYR/PYL/RCAR e subfamílias I (vermelho), II (verde) e III (azul). B: Fosfatases PP2Cs do grupo A, inclui as fosfatases insensíveis a ABA I (azul), fosfatases de resposta hiper sensível a germinação I (vermelho) e hiper sensíveis a ABA1 (verde). C: Quinases SnRK2 da via de sinalização de ABA, Subclasse I (vermelho), Subclasse II (Azul) e Subclasse III (roxo). ARATH: *A. thaliana*; SOLLIC: *S. lycopersicum*; VITVI: *V. vinifera*; CITSI: *C. sinensis*; COFCA: *C. canephora*; ORYSA: *O. sativa*.

Os genes das fosfatases de *C. canephora* apresentam valores de expressão relativamente maiores do que a dos genes receptores e dos genes que codificam as quinases. Esse resultado corrobora com as análises de Marraccini *et al.* (2012) onde o gene CcPYL3 apresentou padrão de expressão menor em *C. canephora* nas condições irrigadas para o genótipo tolerante (clone 14) se comparada a expressão do gene CcPP2C. COFCA 11 é o gene mais expresso dentre os genes PP2Cs analisados neste trabalho. A expressão apresenta-se moderadamente alta em raiz (261.4), pistilo (214.4) e folha (227.1). COFCA 10 destaca-se pela expressão moderadamente alta em raiz (112.3) enquanto nos outros tecidos a expressão é moderada. Finalmente, COFCA 15 evidencia expressão moderadamente alta em endosperma (102.6) e baixa expressão nos outros tecidos.

A expressão dos genes das quinases SnRK2 não foi avaliada em estudos anterior de cafeeiro. Dentre os genes da subclasse III, a clade de maior resposta a ABA, os genes COFCA 19 e 23 apresentaram padrões de expressão moderados, entretanto apenas para raiz o gene COFCA 19 apresentou expressão moderadamente alta (219.3). Estudos anteriores evidenciaram que a expressão dos genes SnRK2 é induzido e regulado durante o desenvolvimento do fruto de tomate e uva (Ben-Ari, 2012). A expressão dos genes SnRK2 em *C. canephora* apresentaram níveis baixos ou moderados em tecidos de semente como o perisperma e endosperma. Expressão moderadamente alta e pontual em raiz (139) foi identificada em COFCA 16.

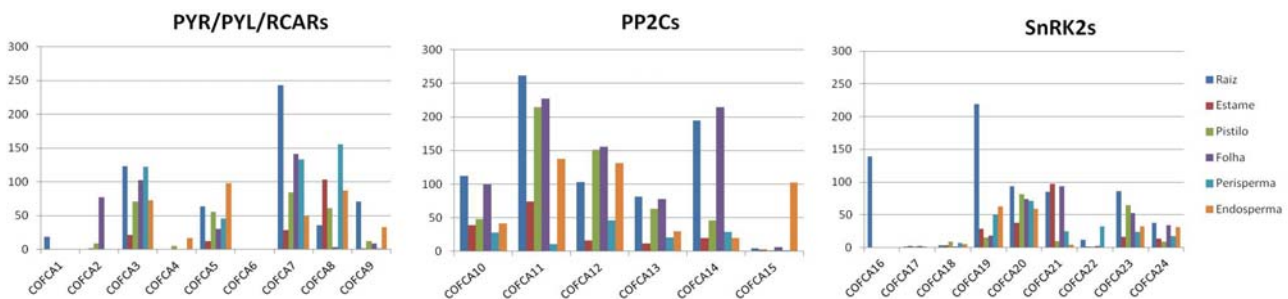


Figura 5: Expressão *in silico* dos genes identificados no sistema tripartite da via de resposta a ABA em *C. canephora*. Os valores do eixo y são os valores de expressão normalizados (RPKM). Os tecidos analisados estão identificados na legenda à direita. Considera-se: expressão baixa valores < 10, expressão moderada 10-99, expressão moderadamente alta 100-999.

CONCLUSÕES

- 1- O sistema de recepção e transdução de sinal de ABA em *C. canephora* é formado por 24 genes, 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 são diferencialmente expressos em tecidos como raízes, folhas, sementes e partes florais segundo as análises de expressão *in silico*.

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.
- CORNFORTH, J.W.; MILBORROW, B.V.; RYBACK, G.; WAREING, P.F. (1965). Chemistry and physiology of Dormins in Sycamore: Identity of Sycamore Dormin with Abscisin II. *Nature*. 205, 1269-70.
- CUTLER, S.R.; RODRIGUEZ, P. L.; FINKELSTEIN, R. R.; ABRAMS, S.R. (2010). Abscisic Acid: Emergence of a Core Signaling Network. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 651-79.
- 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.
- DAVIS, A.P.; TOSH, J.; RUCH, N.; FAY, M.F. (2011). Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. *Bot. J. Linn. Soc.* 167, 357-377.
- DE KOCHKO, A.; AKAFFOU, S.; ANDRADE, A.C.; CAMPA, C.; CROUZILLAT, D.; GUYOT, R.; HAMON, P.; MING, R.; MUELLER, L.A.; PONCET, V.; TRANCHANT-DUBREUIL, C.; HAMON, S. (2010). Advances in coffee genomics. *Adv Bot Res* 53:23-63.
- 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 paralogous in homologous gene sequence databases. *Bioinformatics* 21, 2596-2603.
- FURIHATA, T.; FUJITA, Y.; YOSHIDA, R.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. (2006). Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proc. Natl Acad Sci USA* 103, 1988-1993.
- 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.
- GONZALEZ-GUZMAN, M.; PIZZIO, G.A.; ANTONI, R.; VERA-SIRERA, F.; MERILO, E.; BASSEL, G.W.; FERNANDEZ M.A.; HOLDSWORTH, M.J.; PEREZ-AMADOR, M.A.; KOLLIST, H.; RODRIGUEZ, P.L. (2012) *Arabidopsis* PYR/PYL/RCAR receptors play a major role in quantitative regulation of stomatal aperture and transcriptional response to abscisic acid. *Plant Cell* 24, 2483-2496
- HATANAKA, T.; CHOI, Y.E.; KUSANO, T.; SANO, H. (1999). Transgenic plants of coffee *Coffea canephora* from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Cell Rep* 19, 106-110.
- 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.
- MAZZAFERA, P. (2007) Estresse hídrico e consequências na composição das sementes de café e qualidade da bebida. In Garcia Salva T.J. ; Guerreiro Filho O. ; Thomaziello R. A. ; Fazuoli L. C. ; Eds. Cafés de qualidade: aspectos tecnológicos, científicos e comerciais. IAC: Campinas, SP, Brazil, 73-90.
- 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. (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 SISnRK2 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.; KURUMORI, 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.* (Print), p. s12042-013-9126.