

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CLARA GEROMEL

"METABOLISMO DA SACAROSE EM FRUTOS DE CAFÉ"

Este exemplar corresponde à relação final da tese submetida pelo(s) candidato(s) <i>Clara Geromel</i>
Aprovado pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título
de Doutor em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Mazzaretti

Campinas, 2000

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

G319m

Geromel, Clara

Metabolismo da sacarose em frutos do café / Clara Geromel. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Paulo Mazzafera.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

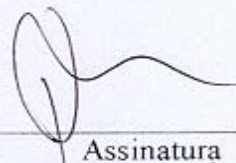
1. Sacarose sintase. 2. Invertase. 3. Sacarose. 4. Sacarose sintase fosfato. 5. Café. I. Mazzafera, Paulo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(scs/ib)

Campinas, 29. de agosto. de 2006

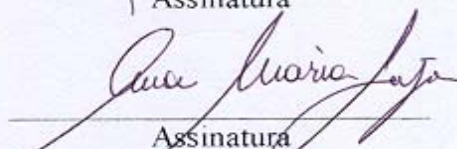
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Mazzafera.....



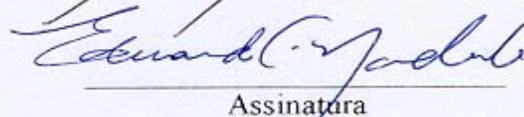
Assinatura

Profa. Dra. Ana Maria Lagoa.....



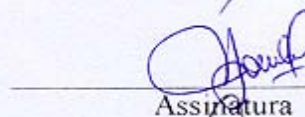
Assinatura

Prof.. Dr. Eduardo Caruso Machado.



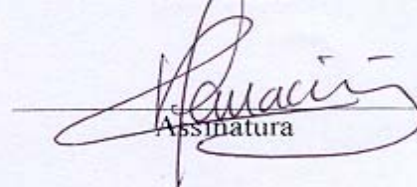
Assinatura

Prof.. Dr. Marcelo C. Dornelas.....



Assinatura

Prof. Dr. Pierre Marraccini....



Assinatura

Prof. Dra. Marlene Schiavinato....

Assinatura

Prof.. Dr. Ladaslav Sodek

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Ao curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da UNICAMP, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), pela parceria no projeto e doação do material vegetal.

Ao professor Dr. Paulo Mazzafera, pela orientação.

Ao pesquisador Dr. Pierre Marraccini, pela participação no projeto, ajuda e pela confiança depositada em mim.

Aos pesquisadores Drs. David Pot, Luiz Gonzaga Esteves Vieira e Thierry Leroy, pela colaboração durante a realização do projeto.

À professora Dra. Sandra Maria Carmelo Guerreiro, pela colaboração nas análises histológicas.

À Lúcia Pereira Ferreira, do IAPAR, pela execução das análises de biologia molecular.

Aos Drs. Marcelo Carnier Dornelas, Marlene Schiavinato e Ladaslav Sodek, por participarem da pré banca.

Aos Drs. Ana Maria Magalhães Andrade Lagoa, Eduardo Caruso Machado, Marcelo Carnier Dornelas e Pierre Marraccini, por participarem da banca examinadora.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia Vegetal.

Aos amigos do laboratório pela grande ajuda, incentivo e pelos bons momentos compartilhados.

À minha família, pelo incentivo e apoio que contribuíram para realização deste trabalho.

Aos meus pais

Angelo Geromel Filho e Maria Altair Busca Geromel

Dedico

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O cafeeiro e o fruto de café	1
1.2. <i>Coffea racemosa</i>	3
1.3. Produtividade vegetal e partição de carbono	4
1.4. Descarregamento do floema	6
1.5. Carboidratos de reserva	7
1.6. O papel das enzimas invertase, sacarose sintase e sacarose fosfato sintase no crescimento e desenvolvimento de sementes	9
1.6.1. Sacarose sintase (SUS)	11
1.6.2. Invertases	14
1.6.3. Sacarose fosfato sintase (SPS)	16
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivos específicos	18

4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1. Material Vegetal	19
4.2. Separação dos tecidos e determinação da massa fresca	21
4.3. Extrações e dosagens dos açúcares	21
4.4. Extrações e ensaios das enzimas invertase ácida vacuolar (IAV), sacarose sintase (SUS) e sacarose fosfato sintase (SPS)	22
4.5. Cortes histológicos	23
4.6. Western blot	24
4.7. Marcação de frutos com $^{14}\text{CO}_2$	24
4.8. Experimentos de biologia molecular	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1. Crescimento dos frutos de <i>C. arabica</i> var. IAPAR 59	28
5.2. Acúmulo de açúcares durante o desenvolvimento de frutos de <i>C. arabica</i>	33
5.3. Atividades de IAV, SUS e SPS em frutos de <i>C. arabica</i>	41
5.3.1. IAV	41
5.3.2. SUS	44
5.3.2.1. Duas isoformas de SUS são codificadas por dois genes distintos	44
5.3.2.2. Atividades de SUS no fruto de café	45

5.3.3. SPS	50
5.4- Estudo histológico em frutos de <i>C. arabica</i>	53
5.5- Ensaio com radioisótopos em <i>C. arabica</i> : fornecimento de ^{14}C	55
5.6- Atividades enzimáticas e expressão dos genes <i>SUS1</i> e <i>SUS2</i> em frutos de <i>C. racemosa</i>	60
6. CONCLUSÕES	64
7. PERSPECTIVAS	66
8. BIBLIOGRAFIA	67
ANEXO	79

RESUMO

Sabendo-se que a produtividade da cultura de café está diretamente ligada a três fatores básicos de produção, climáticos, genéticos e fisiológicos, nesse estudo foram abordados alguns aspectos do metabolismo de carboidratos envolvidos no processo de enchimento dos frutos de café ao longo do seu desenvolvimento. A composição de carboidratos, principalmente de polissacarídeos do grão (endosperma) de café é conhecida, assim como a importância dos açúcares sobre a qualidade da bebida, porém a importação de sacarose a partir de folhas e seu desdobramento nos frutos ainda não são completamente esclarecidos. Os açúcares utilizados no metabolismo das sementes são de extrema importância, tendo como exemplo a regulação da relação fonte-dreno, além de controlar a expressão de genes que codificam algumas enzimas envolvidas no metabolismo de açúcares. O trabalho teve como principal objetivo estudar o metabolismo de sacarose nos frutos de café, ao longo do desenvolvimento. Análises histológicas e fornecimento de compostos marcados mostraram que não existem conexões vasculares entre os tecidos, pericarpo, perisperma e endosperma, mas vasos condutores que percorrem o funículo chegam até o perisperma, permitindo um descarregamento direto de fotoassimilados produzidos nas folhas e dele a transferência para o endosperma, além de receber fotoassimilados do pericarpo, pelo transporte de célula a célula. A fotossíntese no pericarpo diminui ao longo do desenvolvimento do fruto. Grãos de amido foram observados nos estados jovens do perisperma e à medida que surge

o endosperma, esses grãos vão desaparecendo em regiões próximas ao tecido que está sendo formado. As enzimas e os teores de açúcares endógenos avaliados em tecidos separados ao longo da maturação do fruto apresentaram diferenças entre diferentes tratamentos da lavoura (“pleno sol”: condições normais de cultivo, sombreamento e carga reduzida). A sacarose sintase (SUS) apresentou valores de atividades bem maiores que das invertases ácidas (IAV). A sacarose fosfato sintase (SPS) acompanhou o acúmulo de sacarose no estágio inicial no pericarpo de frutos de café. Foi mostrada a existência de duas isoformas de SUS, codificadas por dois genes chamados CaSUS1 e CaSUS2 em *C. arabica*, que possivelmente desempenham diferentes funções metabólicas nos diferentes tecidos do fruto de café. Esses genes apresentam uma expressão diferencial, com CaSUS1 expressando-se nas fases jovens do desenvolvimento do perisperma e do endosperma; porém a expressão de CaSUS2 sobrepõe os picos de atividade SUS detectados e o acúmulo de sacarose nos estados finais de desenvolvimento do pericarpo e do endosperma. Isso sugere que a isoforma CaSUS1 está relacionada à degradação de sacarose, quando parece claro que a isoforma CaSUS2 está relacionada com a síntese desse açúcar. Foi mostrado que esses dois genes se expressam também in *C. racemosa*, pois as sondas CaSUS1 e CaSUS2 de *C. arabica* reconheceram transcritos (mRNA) no endosperma dessa espécie. Portanto, os genes CrSUS1 e CrSUS2 parecem codificar para isoformas de SUS que desempenham funções diferentes daquelas observadas em *C. arábica*; SUS1 parece estar relacionado com a síntese da sacarose.

O sombreamento influenciou na duração do ciclo de desenvolvimento dos frutos, tornando-o mais longo que no pleno sol (respectivamente 260 e 231 dias após o florescimento) e alterando o acúmulo de sacarose nos frutos. Com base nesses resultados fica clara a complexidade do metabolismo de sacarose em frutos de café, visto que nem sempre as atividades enzimáticas seguem o mesmo padrão de acúmulo de açúcares e enzimas de degradação e ressíntese de sacarose atuam simultaneamente, assim como a transferência de açúcares entre os tecidos.

ABSTRACT

Since coffee culture productivity is straightly connected to three basic production factors: climate, genetics and physiology, herein some aspects of the carbohydrates metabolism involved in the process of coffee grains filling through its development were analyzed. It is known the carbohydrates composition, mainly the polysaccharides composition of the coffee grain (endosperm) as well as the importance of sugars in the beverage quality, nevertheless the sucrose import from the leaves and its sharing in the fruits are still to be completely clarified. The sugars utilized in the seeds metabolism are extremely important, such as in the regulation of the drain-source relation and in the expression control of genes that codify some enzymes involved in sugars metabolism. The main goal of this work was to study the sucrose metabolism in coffee fruits through their development. Histological analyses and marked compounds supply showed that there are no vascular connections among the tissues of the pericarp, perisperm and endosperm, but conduction vases that run through the funiculus get to the perisperm, enabling an unloading of photoassimilates produced in the leaves. From the perisperm, these assimilates are transferred to the endosperm; The pericarp photosynthesis diminishes through the fruit development. Starch grains were observed in juvenile stages of the perisperm and during the endosperm formation these grains start to disappear in regions close to the forming tissue. The enzymes and the endogenous sugar level evaluated in separated tissues through fruit maturation show some differences among distinct lavoura treatments ("full sun": ordinary culture conditions, shadowing and reduced loading). The sucrose synthase (SUS)

showed activity values much higher than the ones presented by the acid invertases (IAV). The sucrose phosphate synthase (SPS) followed the sucrose accumulation in the pericarp initial stage in coffee fruits. It was shown the existence of two isoforms of SUS codified by genes called CaSUS1 e CaSUS2 in *C. Arabica*, that possibly play different metabolic roles in different tissues in coffee fruit. These genes show a differential expression, in which CaSUS1 is expressed in the juvenile stage of perisperm and endosperm development; however, CaSUS2 expression overlaps the detected activity peaks of SUS and the sucrose accumulation in the final stages of pericarp and endosperm development. This fact suggests that the CaSUS1 isoform is related to sucrose degradation while it seems clear that the CaSUS2 isoform is related to sucrose synthesis. Both genes were shown to be also expressed in *C. racemosa* since CaSUS1 and CaSUS2 *C. arabica* probes recognized transcripts (mRNA) in this species endosperm. Therefore, CrSUS1 and CrSUS2 genes seem to codify SUS isoforms that play different functions from the ones observed in *C. arabica*; SUS1 seems to be related to sucrose synthesis.

The shadowing has influenced the fruits development cycle duration, turning it longer than in pleno sol (respectively, 260 and 231 days after flowering) and altering the sucrose accumulation in fruits. According to these results, it is clear how complex is the sucrose metabolism in coffee fruits, since it is not always that the same pattern of sugar accumulation is followed by the enzymatic activities and enzyme degradation and sucrose (re)synthesis act simultaneously as well as sugar transference among tissues.

1-INTRODUÇÃO

1.1- O cafeeiro e o fruto de café

Segundo os botânicos, existem mais de 60 espécies de café, sendo que a espécie *Coffea arabica* corresponde a 90% da produção mundial de café, destacam-se também as espécies *Coffea canephora* e *Coffea liberica* com 9% e 1%, respectivamente, da produção mundial (Simpson & Conner-Orgozaly, 1995).

C. arabica ($2n = 4x = 44$ cromossomos) é originária dos planaltos da Etiópia, no leste africano, sendo uma planta exigente em termos de cuidados na nutrição (adubação) e clima, pois prefere temperaturas amenas. A espécie *C. canephora* ($2n = 2x = 22$ cromossomos), também conhecida como Robusta, é planta de regiões mais quentes, sendo originária do Congo. É uma planta rústica, pouco exigente no tratamento nutricional e de temperaturas.

Outras espécies de café, apesar de não serem utilizadas diretamente no comércio, são utilizadas em cruzamentos em programas de melhoramento genético, como a espécie *C. racemosa*, que possui floração abundante e maturação precoce dos frutos, além de resistência a nematóides e ao minador de folhas *Leucoptera coffeella* (Guerreiro Filho, 1992).

O fruto do café pode ser definido como uma drupa de formato ovóide, verde passando de verde a vermelho (ou amarelo) com a maturação. Contém normalmente duas sementes elípticas, que são plano-convexas e possuem um sulco longitudinal sobre a superfície plana. O fruto maduro de café (cereja) é formado por exocarpo, mesocarpo (ou polpa), endocarpo (ou pergaminho), película prateada (resto do perisperma) e endosperma ou semente. O embrião é

situado em um dos lados do endosperma, próximo ao pedúnculo (Fig. 1). A quantidade de grãos é determinada pela fecundação dos dois óvulos presentes no ovário. No entanto, pode ocorrer de apenas um único óvulo ser fecundado, o qual irá ocupar todo o espaço do ovário, gerando um grão único, de formas arredondadas, denominado “moca” ou “caracoli” (Cardoso, 1990).

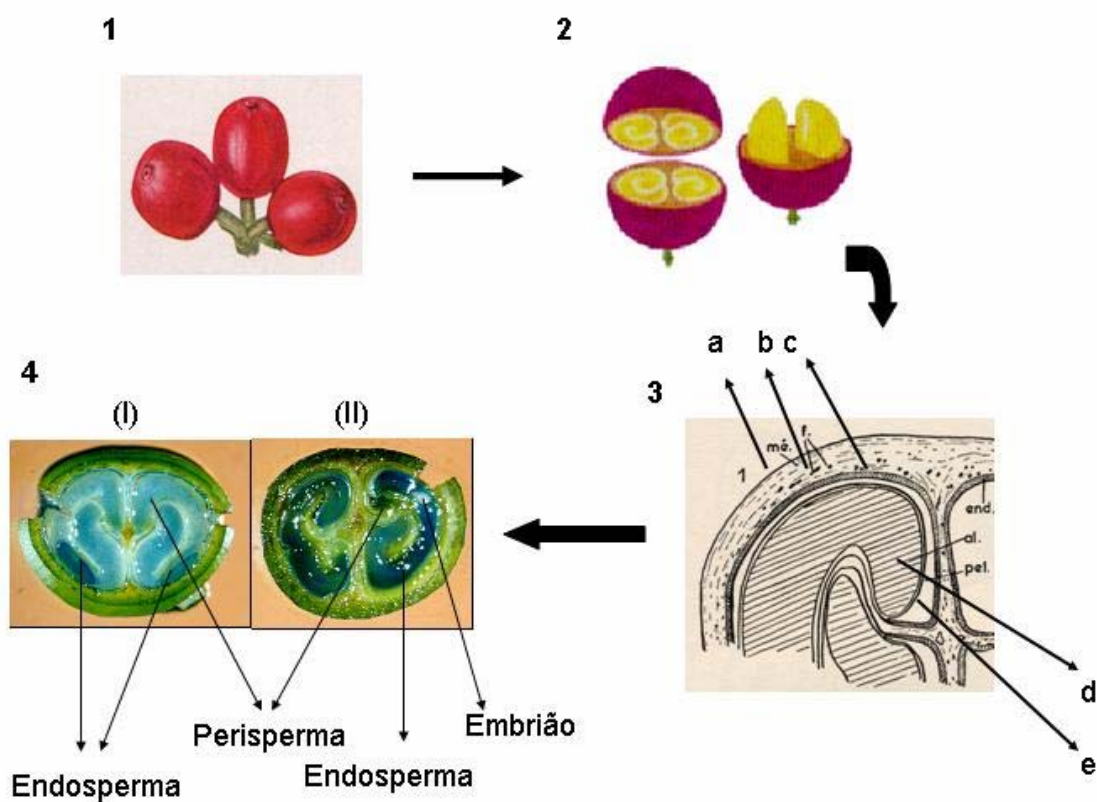


Figura 1. Fruto de café (1), em cortes transversais (2), (3) e (4). Em 3: exocarpo (a), mesocarpo (b), endocarpo (end) ou pergaminho (c), endosperma (ou albumen: al) (d) e perisperma (ou película prateda: pel (e). (4). Corte *in vivo* do fruto de *Coffea arabica*, mostrando a formação dos tecidos: (I) primeiras fases do

desenvolvimento (60-90 dias após florescimento: DAF) e (II) fases finais (120-150 DAF) do desenvolvimento do fruto de café.

Após a floração, o fruto de café, conhecido neste estágio como chumbinho, é formado basicamente por perisperma, um tecido transitório (De Castro & Marraccini, 2006). Com o desenvolvimento do fruto, esse tecido começa a desaparecer e dar espaço para um novo tecido, o endosperma, que somente terá as primeiras divisões mitóticas ao redor de 40 dias após o florescimento e representará mais de 95% da massa da semente madura. O perisperma no final do processo de formação da semente e maturação do fruto ficará representado por 2 a 3 camadas de células, denominado de película prateada. Em outras plantas, dificilmente o perisperma atinge o grau de desenvolvimento como visto em café (Mendes, 1941).

A maturação do café é iniciada com o aumento da atividade respiratória e com a síntese do etileno, acelerando o metabolismo de açúcares e ácidos, a degradação da clorofila e síntese de pigmentos responsáveis pela mudança de coloração do fruto verde a cereja, que ocorrem de maneira simultânea com a síntese de compostos voláteis, ésteres e álcoois, que caracterizam o aroma do fruto maduro (Clifford, 1985).

1.2- *Coffea racemosa*

Os cultivares de *C. arabica* são sensíveis as principais doenças e predadores que atacam o cafeeiro. Por essa razão outras espécies de *Coffea* são utilizadas em cruzamentos para introdução de genes de resistência em *C. arabica*.

A espécie *C. racemosa* é bastante utilizada em cruzamentos com *C. arabica*, pois além de possuir resistência a várias doenças, possui também diversas características agrônômicas favoráveis, tais como, resistência à seca, maturação precoce dos frutos e baixo teor de cafeína nos grãos (Guerreiro Filho, 1992). Quando comparada com outras espécies, *C. racemosa* se destaca quanto ao ciclo de desenvolvimento dos frutos. Em geral esse período é de 180-250 DAF para *C. arabica*, de 270-330 DAF para *C. canephora*, de 330-360 DAF para *C. dewevrei* e *C. liberica* (Levy *et al.*, 1989) para *C. racemosa* apenas 60-110 DAF (Medina Filho *et al.*, 1984; Levy *et al.*, 1989). Apesar do ciclo precoce de maturação, o tamanho dos frutos dessa espécie é bastante reduzido quando comparado com o de *C. arabica*. Em *C. racemosa* o tamanho final do fruto varia entre 5-7 mm (Dedecca, 1957) enquanto *C. arabica* varia 10-18 mm (Guerreiro Filho, 1992). Essa espécie foi também usada no projeto genoma café para gerar 10.566 seqüências de EST (“Expressed Sequence Tags”) (Vieira *et al.*, 2006).

1.3- Produtividade vegetal e partição do carbono

Um dos objetivos dos programas de melhoramento do cafeeiro visa aumentar a produtividade de grãos e vigor vegetativo, mantendo as características organolépticas e de qualidade da bebida. O aumento da produtividade pode ser obtido modificando-se as condições de cultivo (espaçamento entre as plantas e outras manipulações fitotécnicas) ou diretamente pela criação de novas variedades e híbridos mais produtivos. Nesse caso, o aumento da produtividade pode ser a consequência indireta de um aumento da tolerância aos fatores

bióticos (pragas e doenças) ou abióticos (seca e temperatura, por exemplo). Maior produtividade da cultura pode ser conseguida aumentando o tamanho dos grãos, consequentemente, isso pode constituir um critério essencial também na qualidade do café beneficiado nos mercados. Numerosos fatores afetam a qualidade do grão de café, incluindo luminosidade, fornecimento de água, condições climáticas, maturação dos grãos entre outros.

Desde 2002, a International Coffee Organization (ICO, 2002) implementou um programa de melhoria na qualidade do café com recomendações para países exportadores. Foram listadas algumas características indesejáveis e entre elas está a falta de integridade e regularidade na forma dos grãos, além do fato, que o tamanho do grão é uma das características essenciais do ponto de vista comercial, visto que grãos de uma mesma variedade, pode ter preço menor, quando seus grãos apresentam tamanhos reduzidos (Leroy *et al.*, 2006). Isso revela a importância de estudar a relação fonte-dreno no cafeeiro, para melhor entender os mecanismos que controlam o processo de enchimento dos grãos.

O tamanho potencial do fruto depende do número de células e seu volume. O número de células é dependente principalmente de fatores genéticos, enquanto que o tamanho é altamente determinado por fatores ambientais e fisiológicos, que controlam a expansão das células. Geralmente, a taxa de expansão do fruto é proporcional ao fornecimento de assimilados (Ehret & Ho, 1986).

Ho (1996) observou em tomates que o transporte e o metabolismo da sacarose podem afetar o acúmulo de biomassa seca e a qualidade do fruto. Assim, plantas com diferentes hábitos de crescimento e frutificação acumulam

quantidades semelhantes de matéria seca por planta, porém, a partição de biomassa seca é afetado.

Outros dados indicam que o controle da partição de carbono (fotoassimilados) é feito por processos de transporte e transferência localizados no dreno (Farrar *et al.*, 2000). Mesmo sendo esse o principal mecanismo de controle, é evidente a integração entre a fonte e o dreno, sendo a demanda intimamente associada ao fornecimento.

1.4- Descarregamento do floema

De acordo com sua capacidade para exportar fotoassimilados ou sua dependência em importá-los, os órgãos vegetais podem ser classificados em tecidos fonte e dreno, respectivamente. Nas plantas, os carboidratos são exportados entre esses tecidos, principalmente na forma de sacarose, produto final da atividade fotossintética (fonte), exportado pelo floema a longas distâncias até os tecidos “dreno” (Lalonde *et al.*, 1999).

Sementes são excelentes materiais para se estudar o descarregamento e transporte de fotoassimilados (metabolismo fonte-dreno), pois a demanda de fotoassimilados é diferente ao longo do desenvolvimento. Efetivamente, durante o desenvolvimento de sementes observa-se a fase inicial de divisão e de diferenciação celular, seguida pela fase de armazenamento, caracterizada pela expansão em volume das células e associadas ao acúmulo de compostos de reserva, como proteínas, carboidratos e lipídeos, por exemplo (Goldberg *et al.*, 1989).

O modo de transporte de sacarose do tecido fonte para o dreno ainda não é completamente elucidado em todas as espécies vegetais, mas o suprimento de sacarose é um passo limitante para o crescimento dos tecidos dreno. Usando sacarose marcada com isótopo radioativo e analisando a composição da seiva apoplástica de frutos de tomates, foi mostrado que a sacarose pode ser descarregada simplasticamente e/ou apoplasticamente (Damon *et al.*, 1988). Quando o descarregamento ocorre pela rota simplástica, os solutos são transferidos entre as células via espaço citosólico (plasmodesmas) e na rota apoplástica, os solutos são transferidos via parede celular.

Quando a sacarose é descarregada pelo simplasto, ela pode ser preferencialmente hidrolisada pela sacarose sintase (Robinson *et al.*, 1988) e quando ela é descarregada pelo apoplasto, ela é preferencialmente hidrolisada pela invertase ácida da parede celular (Damon *et al.*, 1988). Essas atividades regulam a entrada da sacarose em diferentes rotas bioquímicas, como respiração, biossíntese de polissacarídeos da parede celular ou para armazenamento. Como tais enzimas estão envolvidas no descarregamento e, conseqüentemente, na alocação de carbono nos drenos, interferindo no crescimento e metabolismo, o papel metabólico dessas enzimas de clivagem e síntese da sacarose são motivo de muitos estudos. Assim, a rota de descarregamento do floema pode ser diferente não apenas pelo tipo de dreno, mas também pelo seu desenvolvimento, função e condições de crescimento e mais de uma rota pode existir ao longo do desenvolvimento desse tecido.

Em sementes de café ainda não é conhecido qual o tipo de descarregamento que ocorre durante o desenvolvimento dos drenos.

1.5- Carboidratos de reserva

Os açúcares livres dominantes nos grãos de café são basicamente frutose, glicose e sacarose (Rogers *et al.*, 1999b), porém, traços de outros açúcares como estaquiose, rafinose, arabinose, manose, galactose, ribose e ramnose também são encontrados. A sacarose representa quase o total dos açúcares livres nos grãos maduros de café, porém, o teor pode variar entre espécies. Em *C. arabica* o teor de sacarose na matéria seca pode variar entre 5,1 – 9,4%, no grão maduro, enquanto que em *C. canephora* o teor é bem abaixo disso, ficando entre 4 – 7% (Clifford, 1985; Ky *et al.*, 2001; Campa *et al.*, 2004). Apesar de ser degradada significativamente durante o processo de torração, a sacarose permanece nos grãos torrados na concentração de 0,4 – 2,8% da matéria seca e, provavelmente, está relacionada com o sabor da bebida (Viani, 1986).

A sacarose é considerada um parâmetro importante na qualidade da bebida, pois é um importante precursor do sabor e aroma do café. A formação do aroma é um processo muito complexo, incluindo a reação de Maillard (De Maria *et al.*, 1996), que ocorre durante a torração do café. De acordo com Carvalho *et al.* (1989), durante o processo de torração, a sacarose é o principal contribuinte de açúcares redutores, os quais reagem com aminoácidos (reação de Maillard), dando origem a compostos coloridos desejáveis, responsáveis pela cor marrom do café. Nessas reações são produzidos compostos voláteis, que apresentam grande efeito no aroma do produto final. Alguns precursores de aroma, tais como sacarose e trigonelina, originam produtos com aromas apreciados, incluindo, furanos, pirazinas, alkyl-piridinas e pirroles (De Maria *et al.*, 1996).

Rogers *et al.* (1999b) ao estudarem os teores de açúcares no desenvolvimento dos grãos de café (*C. arabica* var. Caturra) observaram que os teores de glicose no início do desenvolvimento do grão, no perisperma, são maiores que os de sacarose e, ao longo do desenvolvimento, o decréscimo nos teores de glicose é acompanhado pelo aumento no teor de sacarose, enquanto que no endosperma a sacarose é o açúcar predominante no início do desenvolvimento desse tecido. Esses autores sugerem, também, que os altos teores de hexoses no perisperma, pelo menos em certos estádios do crescimento do fruto, representam maior catabolismo de sacarose neste tecido, que é requerido pelo aumento do potencial osmótico, permitindo a expansão inicial e a função de dreno, seguida de uma nova síntese de sacarose exigida pelo endosperma.

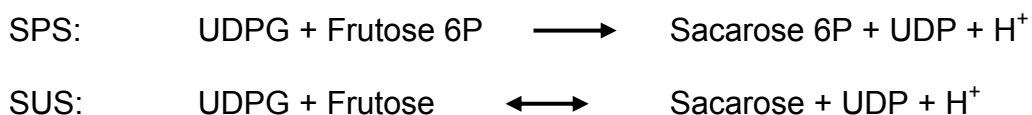
Em grãos verdes de café praticamente não se detecta amido e há alto teor de polissacarídeos associados à parede celular (Wolfrom *et al.*, 1960). Os polissacarídeos encontrados nos grãos verdes de café são principalmente, os galactomananos, que correspondem a 50% dos polissacarídeos, sendo o restante arabinogalactanos, celulose e pectinas, com 30, 15 e 5%, respectivamente. Embora as composições de polissacarídeos de grãos de *C. arabica* e *C. canephora* sejam parecidas, pequenas diferenças são percebidas nas quantidades relativas de galactomanano e arabinogalactano, presentes nas duas espécies (Redgwell *et al.*, 2003).

1.6- O papel das enzimas invertase, sacarose sintase e sacarose fosfato sintase no crescimento e desenvolvimento de sementes

A sacarose desempenha papel crucial no crescimento e desenvolvimento das plantas, pois é uma molécula importante na distribuição de fotoassimilados e como fonte de carbono para manter o metabolismo da célula e crescimento da planta. As disponibilidades de metabólitos (hexoses principalmente) para a síntese de sacarose e demanda por produtos de sua degradação são fatores importantes a vários processos biológicos e são controlados por enzimas de síntese e de degradação (Winter & Huber, 2000).

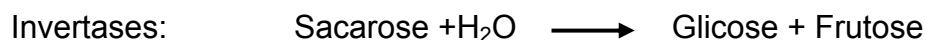
No café, sabe-se que a sacarose é essencial para a qualidade da bebida, pois é um precursor utilizado para formar alguns compostos químicos que participam do aroma e sabor, mas pouco se sabe sobre sua partição e também sobre as enzimas chave que controlam seu metabolismo, como: invertases (EC 3.2.1.26), sintase da sacarose fosfato (SPS: EC 2.4.1.14) e sintase da sacarose (SUS: EC 2.4.1.13).

A biossíntese da sacarose pode ser catalisada por 2 enzimas diferentes:



A síntese de sacarose é geralmente catalisada pela SPS, juntamente com uma fosfatase específica: SPP (EC 3.1.3.24), que hidrolisa a sacarose-6P em sacarose, enquanto a SUS está mais relacionada com a degradação da sacarose (Huber & Huber, 1992).

Além da SUS, a degradação da sacarose pode ser catalisada pelas invertases, sendo uma reação irreversível.



A atuação de cada enzima é dependente de diferentes processos biossintéticos e de armazenamento. A clivagem da sacarose em tecidos dreno fornece substrato para diversas rotas biossintéticas, incluindo a síntese de polissacarídeos da parede celular e amido. Em drenos como sementes, por exemplo, a sacarose que é degradada pela SUS é usualmente associada com a biossíntese de amido, enquanto que a sacarose degradada pela invertase fornece hexoses, supostamente utilizadas para divisão celular nos estádios iniciais de desenvolvimento dos tecidos dreno (Carlson et al., 2002) e também para as atividades de síntese de lipídeos (Hubbard et al., 1991). Em geral, hexoses caracterizam mais as fases de divisão e expansão celular, enquanto que altos teores de sacarose caracterizam as fases de diferenciação e maturação (Borisjuk et al., 2003).

1.6.1- Sacarose sintase (SUS)

A SUS é uma enzima da qual são conhecidas duas isoformas, uma solúvel no citosol, e outra associada à plasmalema (Barrat *et al.*, 2001). A forma citosólica parece fornecer produtos para o metabolismo geral, enquanto a forma associada à plasmalema parece fornecer UDPG (produto da degradação da sacarose) diretamente para a síntese de celulose (Amor *et al.*, 1995), de calose (Salnikov *et*

al., 2003), para formação do amido (Asano *et al.*, 2002) e diversos polissacarídeos da parede celular.

Trabalhos com algodão mostraram que plantas mutantes com baixa atividade da SUS foram incapazes de formar fibras de celulose. Outras análises com plantas mutantes com redução na atividade dessa enzima mostraram que essas plantas apresentavam teores mais baixos de amido em órgãos de armazenamento (ex: raízes de cenoura e tubérculos de batata) (Koch, 2004).

A rota regulatória para esta enzima é relacionada à sua localização celular (Hawker, 1985). Em alguns frutos estudados, nos estádios iniciais do desenvolvimento, a sacarose é descarregada simplasticamente, direto no citosol de células dreno é hidrolisada pela SUS (Ruan & Patrick, 1995). Entretanto, o mecanismo que separa a atividade diferencial da SUS entre o citosol e a plasmalema é desconhecido (Barrat *et al.*, 2001). Em muitos tecidos em crescimento e armazenamento ativo, a atividade dessa enzima é bastante alta (Ross & Davies, 1992) e foi proposto por Sun *et al.* (1992) e Sung *et al.* (1989b) que sua atividade pode servir como um indicador bioquímico de crescimento ativo do dreno. Em frutos de *Cyphomandra betacea*, Ordóñez *et al.* (2005) observaram que a atividade da SUS foi maior logo no início do desenvolvimento, diminuindo posteriormente. Nesse trabalho, os autores determinam a força do dreno na primeira fase do desenvolvimento do fruto pelo pico de atividade da enzima.

No grão de milho, duas isoformas dessa proteína, SS1 e SUS-SH1, haviam sido descritas e são codificadas por dois locos de genes homólogos, *Sus1* e *Sh1*. O gene *Sh1* é expresso de forma mais abundante em endosperma em desenvolvimento, contribuindo com mais de 90% da atividade total da SUS, que

coincide com a rápida fase de biossíntese de amido (Chourey, 1981). O gene *Sus1* é expresso em muitos tecidos, incluindo raízes de plântulas, endospermas e embrião (Chen & Chourey, 1989). Estudos recentes descreveram outra isoforma dessa proteína: SS2 (previamente chamada de SUS3), passando a ser conhecida, em milho três isoformas: SUS1, SUS-SH1 e SUS2, as quais são codificadas pelos genes *Sus1*, *Sh1* e *Sus2*, respectivamente (Duncan *et al.*, 2006).

Em estudos realizados em raízes de beterraba em desenvolvimento, foi mostrada a existência de duas isoformas de SUS: SUS1 e SUS2. A isoforma SUS1, com ponto isoelétrico de 5.7, foi observada em raízes nos estádios iniciais do desenvolvimento, enquanto a isoforma SUS2, com ponto isoelétrico de 6.1, apareceu em estádios mais avançados, próximos à maturação. As duas isoformas se distinguem pelo pH ótimo de funcionamento, sugerindo diferentes papéis, podendo desempenhar diferentes funções metabólicas. Elas têm a capacidade de atuar na síntese e na degradação da sacarose, porém essa eficiência pode variar em decorrência do pH. Mudanças no pH citoplasmático podem fornecer um mecanismo de rápido ajuste da atividade da SUS sem precisar de alterações na expressão dos genes. As isoformas SUS1 e SUS2 diferem à resposta na mudança de pH, apresentando diferentes pHs ótimos nas reações de síntese e degradação da sacarose. Para a degradação da sacarose a SUS1 exibe máxima atividade no pH 6 e a SUS2 no pH 6,5. Para a síntese de sacarose o pH ótimo para SUS1 é 7,5, enquanto que para SUS2 o pH ótimo para máxima atividade é 7 (Klotz *et al.*, 2003). As duas isoformas são tetrâmeras, com massa molecular de 320 kDa e com propriedades cinéticas similares. As isoformas diferem quanto às subunidades. A isoforma 1 (SUS1) é composta de duas subunidades de 84 kDa e

duas de 86 kDa, a isoforma 2 (SUS2) é um homotetrâmero com subunidade de 86 kDa. As duas isoformas apresentaram semelhança quanto à composição dos aminoácidos, porém diferem no conteúdo de alanina, glicina, isoleucina e lisina. Diferenças observadas no conteúdo das subunidades e no pH sugerem que múltiplas isoformas de SUS podem desenvolver um mecanismo para regular o metabolismo de sacarose em raízes de beterraba, pela regulação diferencial das duas isoformas e modulação de suas atividades pela mudança no pH celular (Klotz *et al.*, 2003).

Em frutos de pêra japonesa também foram encontradas duas isoformas para essa enzima, SUS1 e SUS2 (Tanase & Yamaki, 2000). A SUS1 normalmente aparece em frutos jovens e a SUS2 em frutos maduros. As duas isoformas são homotetrâmeras com subunidades de 83 kDa e os autores concluíram que essas duas isoformas desempenham diferentes rotas na utilização de carboidratos em frutos jovens e maduros.

1.6.2- Invertases

Três isoformas de invertases são encontradas em plantas, as quais diferem nas suas propriedades bioquímicas, localização celular e função (Roitsch & González, 2004).

A invertase neutra está localizada no citosol de células vegetais, com atividade em pH 7 – 7,8 (Quick & Schaffer, 1996) e tem a função de catabolismo (Roitsch & González, 2004).

As invertases ácidas, com atividade em pH 4 – 4,5 (Quick & Schaffer, 1996) ou estão ligadas à parede celular, envolvidas na partição de sacarose, fora dos

tecidos dreno, no apoplasto, estabelecendo um gradiente de concentração de sacarose da fonte para o dreno (Escherich, 1980), ou estão localizadas nos vacúolos das células, relacionadas no armazenamento de açúcares, regulação osmótica e respostas ao estresse abiótico (Roitsch & González, 2004).

A invertase extracelular é uma enzima chave na rota de descarregamento apoplástico. A distribuição de carboidratos por essa rota permite um mecanismo para um ajuste rápido e flexível, de acordo com a variação na demanda (Roitsch *et al.*, 2003). Essa invertase tem sido associada com o transporte de açúcares em zonas de crescimento ativo, tais como frutos (Copeland, 1990).

A invertase vacuolar (IAV) também parece controlar a rota primária de clivagem da sacarose em tecidos em expansão (Winter & Huber, 2000) e em tecidos maduros (Copeland, 1990) e contribui para o fluxo de hexose através do tonoplasto e para a entrada de hexoses no metabolismo citoplasmático. O controle temporal de ambos os processos é facilitado pela compartimentalização, o qual pode integrar uma função importante e sinalizadora de invertase ácida vacuolar com seu papel osmótico na expansão (Koch, 2004).

De acordo com a hipótese que as hexoses favorecem a divisão e expansão celular, as invertases servem de indicador para iniciação e expansão de novas estruturas de drenos (Koch & Zeng, 2002), normalmente com atividade vacuolar antecedendo a da parede celular (Andersen *et al.*, 2002).

A invertase alcalina, localizada no citoplasma, é considerada uma enzima de manutenção, envolvida na degradação de sacarose quando as atividades da invertase ácida da parede celular e SUS são baixas (Copeland, 1990).

Cada tipo de invertase faz parte de uma família de genes, sendo cada tipo codificado por vários genes (Sturm, 1999).

1.6.3- Sacarose fosfato sintase (SPS)

A SPS é uma enzima chave na biossíntese de sacarose em tecidos fotossintéticos e não fotossintéticos. Apesar de sua atividade ser bastante alta em tecidos fonte, nos tecidos dreno ela também está ativa, envolvida no ciclo de degradação e (re)síntese de sacarose que contribui para a regulação na importação e mobilização desse carboidrato (Wendler *et al.*, 1990).

A SPS pode ser regulada por diferentes mecanismos, como regulação alostérica, envolvendo ativação pela glicose 6P (Glc6P) e inibição por fosfato inorgânico (Pi) (Doehlert & Huber 1984). A síntese de sacarose pode ser imediatamente aumentada em resposta ao aumento na disponibilidade de precursores. Outro mecanismo de regulação é por fosforilação de proteínas (Huber *et al.*, 1995). A fosforilação induz uma diminuição na afinidade da enzima pelo substrato, sendo mais susceptível à inibição por Pi e mais dependente de Glc6P (Siegl & Still, 1990).

A expressão da SPS também é regulada. Foi visto que a expressão aumenta à medida que o tecido passa de dreno para fonte (Walker & Huber, 1989). Hubbard *et al.* (1990) observaram que a SPS está envolvida na conversão do amido em açúcares solúveis em frutos de banana. Em pêssegos, foi visto que a atividade da SPS apresentou correlação positiva com o acúmulo de sacarose, evidenciando que ela também está envolvida no metabolismo de sacarose dos drenos (Hubbard *et al.*, 1991).

2- JUSTIFICATIVA

Na literatura há poucos trabalhos sobre o metabolismo da sacarose e a qualidade do fruto de café. Logo, é relevante esse estudo, pois se sabe que a sacarose é o principal carboidrato envolvido na qualidade da bebida, pois é um importante precursor de vários compostos que vão dar sabor e aroma à bebida de café, além de ser o fotoassimilado transportado pelas plantas superiores e envolvida na relação fonte-dreno. É de extrema importância entender como ocorre o desdobramento e a importação desse dissacarídeo à partir das folhas, e a contribuição de cada tecido do fruto, principalmente do perisperma, na partição e alocação de carbono ao longo do desenvolvimento dos frutos.

Quando comparada com *C. arabica*, a espécie *C. racemosa* apresenta uma peculiaridade quando ao ciclo de desenvolvimento dos frutos, que é aproximadamente três vezes menor. Além, disso as duas espécies foram usadas para gerar EST ("Expressed Sequence Tags") no projeto Genoma café (Viera *et al.*, 2006).

3- OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar o metabolismo de sacarose nos grãos de café, ao longo do desenvolvimento.

3.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detalhar o crescimento e desenvolvimento dos frutos através do estudo de evolução dos tecidos, separados ao longo da maturação;
- Analisar os frutos histologicamente para verificar a conexão entre os tecidos;
- Analisar a partição de carbono no fruto e as relações entre os tecidos através do fornecimento de sacarose e frutose marcadas com ^{14}C ;
- Nos diferentes tecidos do fruto, dosar as atividades das enzimas SUS, IAV e SPS e os teores de açúcares ao longo da maturação;
- Comparar os dados de dosagens de açúcares e enzimas com a expressão dos genes *CaSUS1* e *CaSUS2* previamente clonados;
- Analisar os efeitos da sombra e da carga reduzida de frutos sobre o metabolismo dos açúcares ao longo do desenvolvimento dos frutos;
- Analisar o metabolismo dos açúcares ao longo da maturação dos frutos de *C. racemosa*, para comparar os resultados aos observados em *C. arabica*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Material Vegetal

Ano 2002/2003: Foi realizada a coleta de frutos de *C. arabica* var. IAPAR 59, de plantas cultivadas a pleno sol no Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), Londrina - PR. A coleta foi realizada ao longo do desenvolvimento dos frutos (setembro 2002 – maio 2003), aproximadamente a cada 30 dias após o florescimento (DAF), entre 13:00 e 16:00h. Nesses frutos foram determinadas as massas frescas e foram separados os tecidos pericarpo, perisperma e endosperma (quando este já estava presente). O conteúdo de açúcares solúveis totais (AST), de açúcares redutores (AR) e sacarose; as atividades enzimáticas da IAV, SUS e análises por Northern-blot (para analisar a expressão dos genes *CaSUS1* e *CaSUS2*), foram determinadas em cada um dos tecidos. Análise de Western-blo foi realizada apenas no endosperma.

Ano 2003/2004: Também foi realizada a coleta de frutos de *C. arabica* var. IAPAR 59, de plantas cultivadas a pleno sol no IAPAR. A coleta foi realizada ao longo do desenvolvimento (setembro 2003 – maio 2004), como definido previamente. Nesse ano, além da segunda coleta dos frutos das mesmas plantas cultivadas em pleno sol (controle), foram feitas coletas de plantas submetidas a dois diferentes tratamentos: plantas com sombreamento de 50% e plantas com carga reduzida à 30% de frutos. As condições de sombreamento foram conseguidas artificialmente, utilizando sombrite 50%. Para o tratamento com carga reduzida, na floração, os botões florais foram reduzidos à 30% dos botões iniciais.

As mesmas análises feitas na safra 2002/2003, foram realizadas nesse ano, exceto os ensaios de Northern-blot dos genes *CaSUS1* e *CaSUS2*, que foram realizados somente no endosperma. Apenas nos endospermas de plantas controle foi feito Western-blot.

Ano 2004/2005: Foi realizada a coleta dos frutos de *C. racemosa*, ao longo do desenvolvimento (novembro 2004 – janeiro 2005), em plantas cultivadas em pleno sol, no IAPAR, aproximadamente a cada 15 DAF, entre 13:00 e 16:00h. Nesses frutos foram determinadas as massas frescas, dosados AST, AR, sacarose, atividades enzimáticas de IAV e SUS, além de Northern-blot dos genes *CaSUS1* e *CaSUS2* somente nos endospermas dos frutos.

Foram também colhidos frutos de *C. arabica* var. Catuaí Vermelho de plantas cultivadas em pleno sol na área experimental do Departamento de Fisiologia Vegetal da Unicamp, em três estádios de desenvolvimento, aproximadamente aos 50 DAF (endosperma ainda não formado), 110 DAF (com endosperma em formação) e 220 DAF (endosperma completamente formado). Esses materiais foram usados para cortes histológicos e experiências de fornecimento de $^{14}\text{CO}_2$. Para ambos os experimentos os frutos foram utilizados no momento da coleta.

Em todas as coletas, os frutos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C . Para as análises de AR, AST, sacarose, atividades enzimáticas, os tecidos (pericarpo, perisperma e endosperma) foram separados e colocados em tampão fosfato 100 mM acrescido de 2% de ácido ascórbico, para evitar a oxidação. O excesso de tampão foi

removido e os tecidos foram congelados (primeiramente em nitrogênio líquido e em seguida armazenado a -80°C) antes de serem analisados. Para os experimentos de biologia molecular, os tecidos foram também separados, porém sem uso do tampão fosfato e ácido ascórbico. Essas análises de biologia molecular foram realizadas no laboratório de Biotecnologia do IAPAR, sob a supervisão do pesquisador Dr. Pierre Marraccini.

4.2- Separação dos tecidos e determinação da massa fresca

Para as medidas de peso, os frutos foram colocados em tampão fosfato acrescido de 2% de ácido ascórbico, até o descongelamento e pesados inteiros. Após as pesagens, foram feitas as separações dos tecidos, pericarpo, perisperma e endosperma, com auxílio de bisturi e então pesados separadamente. Foram pesados vinte frutos no primeiro estágio e 10 nos demais, e calculadas as médias em cada estágio de desenvolvimento.

4.3- Extrações e dosagens de açúcares

As amostras congeladas foram liofilizadas e moídas em microtritador (Politron) com etanol 80%, na proporção de 3 mL para cada 1 g de material. Em seguida, foram feitas três extrações seqüenciais, cada uma com o mesmo volume de etanol, em tubos fechados, em banho-maria, a 75°C por 30 minutos, com agitações ocasionais. Após as centrifugações, os sobrenadantes das três extrações foram combinados e neles dosados AST (Dubois *et al.*, 1956), AR (Somogyi, 1952) e sacarose (Van Handel, 1968).

Cada amostra era formada por mais de um fruto e a pesagem foi feita aleatoriamente, formando assim uma amostra composta. Foram feitas três repetições para cada amostra.

4.4- Extrações e ensaios das enzimas invertase ácida vacuolar (IAV), sacarose sintase (SUS) e sacarose fosfato sintase (SPS)

O material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido, utilizando tampão Hepes 100 mM, pH 7,0 contendo 2 mM $MgCl_2$, 5 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoetanol e 2% de ácido ascórbico. Para cada 1g de material foi utilizado 5-7 ml de tampão resfriado a 4°C. O extrato foi deixado em gelo por trinta minutos, com agitação ocasional e depois centrifugado a 27.000 *g* por 20 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes foram recuperados e passados em colunas PD10 – Sephadex G25 (Amersham biosciences). A eluição das proteínas foi feita com tampão Hepes 20 mM, pH 7,0. Nos extratos protéicos filtrados, foram determinados os teores de proteínas (Bradford, 1976) com o reagente da Bio-Rad.

A composição do meio de reação para a IAV foi 60 µg de proteína, 25 mM de sacarose e tampão citrato 50 mM, pH 3,5. (modificado de Yelle *et al.*, 1991). As reações foram incubadas por 1 h, a 37°C e paralisada congelando as amostras em nitrogênio líquido. Os AR foram dosados pelo método de Somogyi (1952).

A composição do meio de reação para a SUS foi na direção de síntese de sacarose, contendo 60 µg proteína, 25 mM de uridina 5'-difosfoglicose (UDPG), 25 mM de D-frutose e tampão MES 50 mM, pH 6,0. As reações foram incubadas por

1 hora a 30°C e as reações paralisadas com a adição de KOH 30% e fervidas por 10 minutos. A sacarose formada foi dosada pelo método de Van Handel (1968).

A composição do meio de reação para SPS foi de 60 µg proteína, 25 mM de UDPG, 25 mM de frutose 6-fosfato, 30 mM de glicose 6-fosfato, 20 mM de fenil-β-glicoside e tampão fosfato 50 mM, pH 7,5 (modificado de Lowell *et al.*, 1989). As reações foram incubadas por 1 h, a 37°C e as reações paralisadas com a adição de KOH 30% e fervidas por 10 minutos. A sacarose formada foi dosada pelo método de Van Handel (1968).

Assim como nas dosagens de açúcares, as compostas eram compostas e foram feitas três repetições para cada amostra.

4.5- Cortes histológicos

As sementes foram fixadas em tampão de formalina neutro com 10% (v/v) de formol, 0,4% (w/v) de NaH₂PO₄.H₂O e 0,65% (w/v) de NaH₂PO₄ anidro, no momento da coleta. A desidratação foi feita seqüencialmente com etanol, em diferentes concentrações: 30, 50 e 70% (v/v), por 12 h, em cada concentração. O material foi tratado com resina plástica (Historesin, Leica) seguindo o protocolo de Gerrits & Smid (1983). Os blocos de resina polimerizados foram colados em blocos de madeira com adesivo plástico e os cortes feitos em micrótomo, na espessura de 12 µm. Os cortes foram colocados em lâminas e aquecidos a 65°C e corados com azul de toluidina 0,05% (v/v) em tampão acetato 0,1 M, pH 4,7 por 3 minutos e lavados com água por 5 minutos (O' Brien *et al.*, 1964). As lâminas usadas para observar amido, foram submetidas a reações com Lugol (Johansen,

1940). As lâminas, após serem observadas em microscópio (Olympus, modelo BX51), foram fotografadas.

4.6- Western-blot

Extratos protéicos de endosperma da safra 2003/2004 foram testados pela técnica de Western-blot, para identificar a presença da proteína SUS. As proteínas solúveis totais foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (10%), semi-desnaturante, com inclusão de SDS no tampão e transferidas em membrana de nylon Hybond N⁺ (Amersham) usando o Bio Rad Mini P trans-Blot. As membranas foram incubadas com o anticorpo policlonal de SUS (isoforma de SUS1, de ervilha) usando o protocolo descrito por Déjardin *et al.* (1997a,b). O anticorpo usado, foi uma doação de C. Rochat do INRA, França. As membranas foram reveladas usando o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com a fosfatase alcalina e coradas com 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) e nitro blue tetrazolium (NBT) (Walker & Pollock, 1993).

4.7- Marcação de frutos com ¹⁴CO₂

Foram realizados 3 experimentos diferentes utilizando ¹⁴CO₂. O primeiro experimento foi o fornecimento de ¹⁴CO₂ em folhas e frutos. A incubação com ¹⁴CO₂ foi feita em ramos contendo frutos com aproximadamente 120 ± 20 DAF, onde o pericarpo, perisperma e endosperma representavam 52%, 20% e 28% respectivamente, da massa fresca do fruto, ou em ramos com folhas, envoltos em sacos plásticos. No ensacamento dos ramos, foram retiradas as folhas, mantendo-

se apenas quatro por ramo, ficando apenas o quarto e o quinto par, como mostrado na figura 2. Dentro dos sacos plásticos, foram deixados dois tubos de Eppendorf, um continha solução aquosa 10 Mdpm $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (50-62 mCi mmol^{-1} , Amersham Biosciences) e o outro continha 1 M HCl. Após a completa vedação do saco plástico, os conteúdos dos tubos Eppendorf foram misturados, por manuseio externo, promovendo a liberação de $^{14}\text{CO}_2$. O fornecimento de $^{14}\text{CO}_2$ foi feito entre 6 e 7 horas da manhã, durante 4 h, e a seguir o envoltório plástico foi retirado. A coleta dos frutos para análise foi feita no dia seguinte, aproximadamente 24 horas após aplicação de $^{14}\text{CO}_2$. Os frutos foram separados em pericarpo, perisperma e endosperma, congelados e liofilizados. Nesse material foram dosados os AR e sacarose, como já descrito anteriormente e determinadas as radioatividades, após adição do líquido de cintilação e contagem por 5 minutos em contador de cintilação.

O segundo experimento foi realizado com o fornecimento de $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ sacarose e $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ frutose. Frutos com aproximadamente 120 DAF foram coletados e imediatamente colocados em água fria. O pedúnculo foi retirado com o auxílio de um bisturi e neste local aplicados os açúcares marcados com ^{14}C . Os frutos foram colocados dentro de uma caixa tipo “gerbox” transparente, com auxílio de lanolina deixando o lado dos pedúnculos para cima. No centro da caixa foi colocado um pedaço de papel de filtro saturado com água, para manter a umidade e a caixa foi colocada sob a luz de uma lâmpada incandescente 100 W, posicionada a 50 cm. Foram utilizados 10 frutos para cada tratamento onde cada fruto recebeu 0.9 μCi $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ sacarose (50 $\mu\text{Ci.mmol}^{-1}$) ou $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ frutose (50 $\mu\text{Ci.mmol}^{-1}$) (Amersham Biosciences) Após a absorção da solução radioativa,

foram adicionadas gotículas de tampão fosfato 0,1M pH 7 sobre o local do corte para evitar desidratação. Em seguida, a caixa tipo “gerbox” foi tampada e o material incubado por 24 horas. Após esse período, os frutos foram separados em pericarpo, perisperma e endosperma, congelados e liofilizados. Como no experimento anterior, os açúcares foram extraídos dos diferentes tecidos e as radioatividades determinadas.

No terceiro experimento, foram utilizados frutos em diferentes estádios de desenvolvimento denominados: chumbinho (60 DAF: apenas polpa e perisperma), estágio 1 (130 DAF: com endosperma em formação), estágio 2 (165 DAF: com endosperma desenvolvido) e maduro (240 DAF: polpa completamente vermelha). Esses frutos foram coletados da mesma planta e colocados dentro de um recipiente de vidro. Os frutos foram incubados em uma solução de 4 Mdpm $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (50-62 mCi.mmol⁻¹, Amersham Biosciences) e algumas gotas de HCl 3 N. O recipiente de vidro foi lacrado com tampa de borracha e deixado sob a luz de uma lâmpada incandescente 100 W, por 4 horas. Depois desse período, o recipiente foi aberto e nele foi introduzido um frasco com KOH 10% e lacrado novamente. Esse frasco foi deixado por mais 24 horas na luz. Após esse período, os frutos foram separados em pericarpo, perisperma e endosperma (quando presente), congelados e liofilizados. Nesses tecidos foram feitas extrações de açúcares e determinadas as atividades, como nos experimentos anteriores.

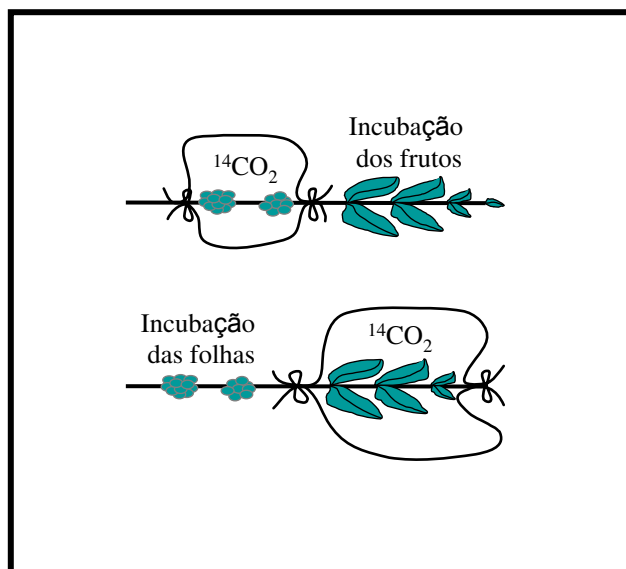


Figura 2: Esquema do fornecimento de $^{14}\text{CO}_2$ para folhas e frutos.

4.8- Experimentos de biologia molecular

Todos os experimentos de biologia molecular estão descritos no Anexo 1, que traz o trabalho resultante dessa tese e publicado no periódico *Journal of Experimental Botany* (Geromel *et al.*, 2006).

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Crescimento dos frutos de *C. arabica* var. IAPAR 59

Os dados relativos ao crescimento dos frutos são apresentados nas figuras 3 e 4. A figura 3 apresenta a porcentagem de massa fresca em cada tecido separadamente (Fig. 3A) e a massa fresca no fruto inteiro (Fig. 3B), durante seu desenvolvimento, referente a coleta do ano de 2002/2003. A figura 4 é referente a coleta do ano de 2003/2004 e mostra os dados de massa fresca nos três tratamentos realizados neste ano, apresenta a porcentagem de massa fresca nos tecidos separados, no controle (Fig. 4A), no tratamento com carga reduzida a 30% (Fig. 4B), com sombreamento de 50% (Fig. 4C) e a massa fresca no fruto inteiro de café, nos 3 tratamentos (Fig. 4D).

Os frutos de café na coleta do ano 2002/2003 completaram seu ciclo de maturação aos 219 DAF (Fig. 3). Na coleta de 2003/2004 no controle (Fig. 4A) e no tratamento com carga reduzida a 30% (Fig. 4B), o ciclo de maturação dos frutos foi de 231 DAF, porém o sombreamento de 50% nas plantas, afetou significativamente o período de maturação dos frutos, que foi de 260 DAF.

No primeiro mês de coleta (30 DAF), devido ao tamanho muito pequeno dos frutos (< 2 mm), não foi possível separar o pericarpo dos outros tecidos, o qual mostra a ausência deste dado em todos os gráficos das figuras 3 e 4.

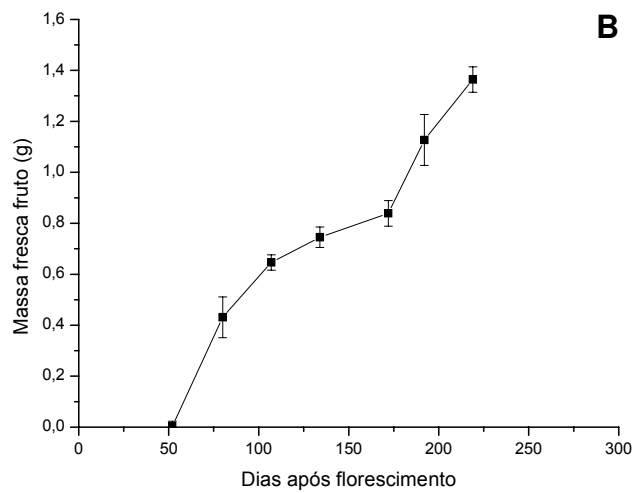
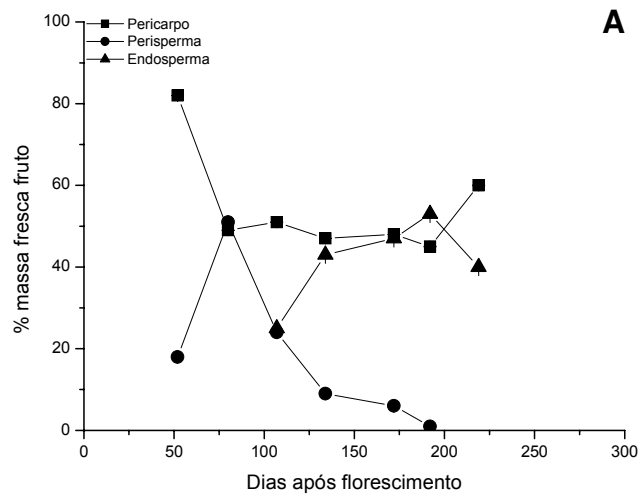


Figura 3: Porcentagem de massa fresca nos diferentes tecidos (A) e massa fresca dos frutos inteiros (B) ao longo do desenvolvimento dos frutos (Safrá 2002-2003). As barras indicam os desvios padrões, calculados de dez repetições.

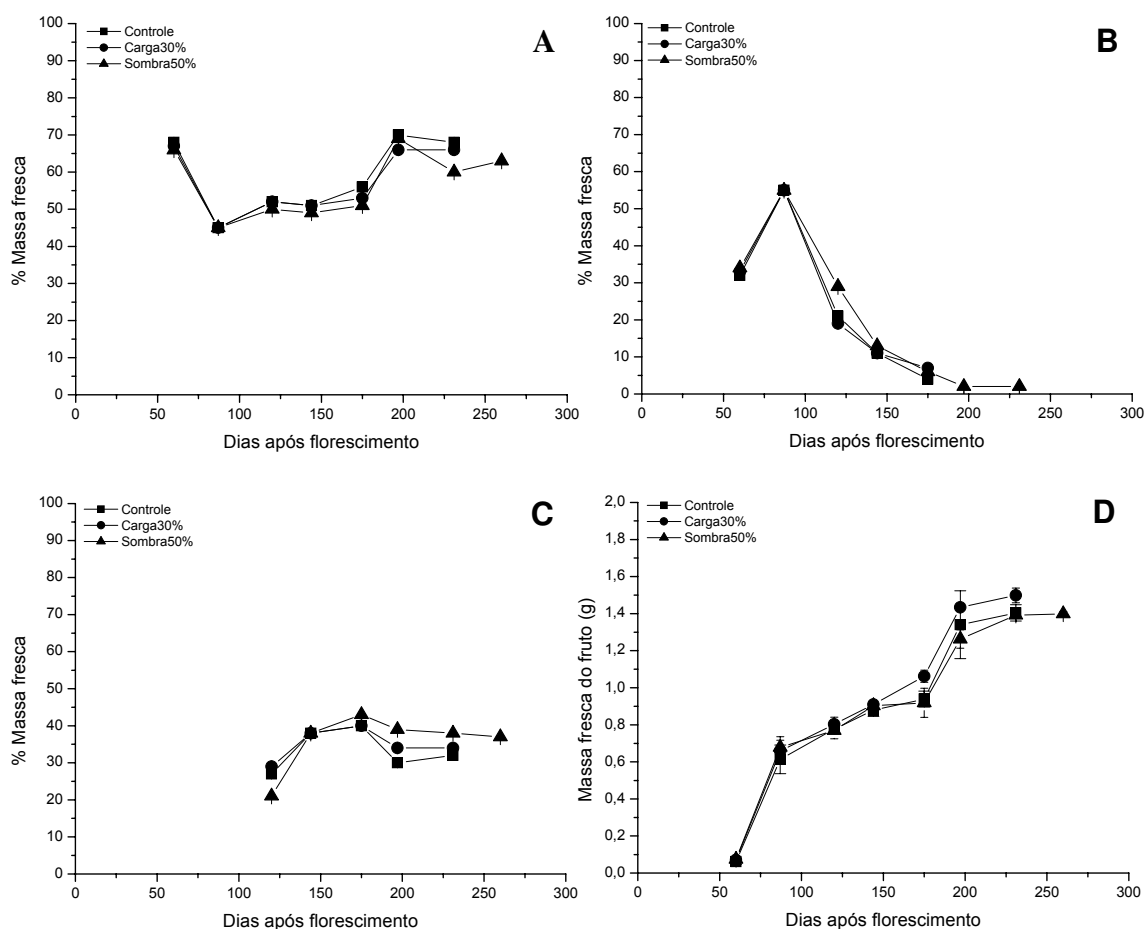


Figura 4: Porcentagem de massa fresca de frutos de café ao longo do desenvolvimento, no pericarpo (A), perisperma (B) e endosperma (C), no controle e nos tratamentos com carga reduzida e sombreamento. Massa fresca dos frutos inteiros nos diferentes tratamentos (D), referentes à coleta 2003/2004. As barras indicam os desvios padrões, calculados de dez repetições.

Devido a ausência dos dados do primeiro mês de coleta, não foi possível mostrar a primeira fase do crescimento do fruto, caracterizada por um crescimento lento. Alguns autores afirmam que a duração dessa fase é de 15 dias (Ramaiah & Vasudeva, 1969) enquanto outros consideram até 28 dias (Wormer, 1964).

As variações quanto a duração de cada fase, podem estar relacionadas com as cultivares e as condições climáticas (Salazar-Gutiérrez *et al.*, 1994). Existem registros de uso de vários tipos de curvas para descrever o crescimento do fruto de café em massa fresca e massa seca, como a sigmoidal, dupla sigmoidal ou mesmo a linear (Portes & Castro Junior, 1991). Tentado assim, relacionar o crescimento com diferentes variações climáticas.

Nos dois anos de coleta, o desenvolvimento dos frutos de café se enquadra na curva sigmoidal. A segunda fase de crescimento é caracterizada por um rápido aumento de massa fresca entre 60 e 90 DAF (Figs. 3B e 4D), assim como no perisperma, que há um aumento na porcentagem de massa fresca (Figs. 3A e 4B) e conseqüentemente, redução na porcentagem de massa fresca do pericarpo (Figs. 3A e 4A). Neste período o perisperma apresenta uma rápida expansão, pois essa é uma fase de intensas divisões celulares, ocupando todo espaço interno do lóculo (Mendes, 1942). Esse aumento de massa fresca no fruto (Figs. 3B e 4D), está associado ao acúmulo de água pelo perisperma para posterior desenvolvimento do endosperma (Rogers *et al.*, 1999b).

Após esse período, o endosperma passa a ser detectado, a partir dos 75 DAF e facilmente extraído do fruto aos 107 e 120 DAF nas coletas de 2002/2003 e 2003/2004, respectivamente. Aos 107 (2002/2003) e 120 (2003/2004) DAF, o perisperma e endosperma estão presentes em porcentagens próximas, quanto a

massa fresca do fruto. Após esse período, o perisperma desaparece gradualmente a medida que o endosperma continua a se desenvolver. Em frutos de plantas a pleno sol, o desaparecimento do perisperma é mais rápido do que em frutos de plantas sombreadas, que persistem por mais 30 dias aproximadamente (Fig. 4B). Com a maturação do fruto, o perisperma se torna uma fina camada que envolve o endosperma, denominada película prateada. Na coleta de 2002/2003 (Fig. 3A) a porcentagem de massa fresca do endosperma continua aumentando até os 192 DAF (Fig. 3A), enquanto na coleta do ano seguinte, esse aumento na porcentagem de massa fresca vai até os 231 DAF no controle e aos 192 DAF nos tratamentos com carga reduzida e sombreamento (Fig. 4C).

Entre os períodos de 134 a 172 DAF (2002/2003) e entre 144 a 175 DAF (2003/2004), o endosperma passa de leitoso para sólido durante a fase denominada de “fase de armazenamento” e também caracterizando a terceira fase do desenvolvimento do fruto, seguida de uma desidratação no último mês de desenvolvimento. Na fase de armazenamento, também é observada intensa expressão de genes, que será discutida posteriormente. Sendo um tecido de armazenamento, o endosperma maduro, acumula compostos que servirão como reservas de nutrientes como por exemplo a proteína 11S (Rogers *et al.*, 1999a), que serão mobilizadas para o embrião durante o processo de germinação da semente,.

No final da maturação, como mostra a figura 4A, o maior ganho de massa fresca foi observado em frutos de plantas submetidas ao tratamento de carga reduzida e a maior porcentagem de massa fresca no endosperma foi encontrado

em plantas sombreadas. Porém quando esses experimentos foram submetidos a análise estatística, não houveram diferenças significativas entre os tratamentos.

Planta sombreada naturalmente ou artificialmente, pode fornecer grãos de café de melhor qualidade, provavelmente pela diminuição do estresse da planta, favorecendo um lento amadurecimento e mais adequado enchimento dos grãos, além de mudanças nas composições químicas dos frutos (Vaast *et al.*, 2006). Estudo com plantas submetidas a sombreamento e carga reduzida, mostrou que plantas sombreadas produziram maiores porcentagens de frutos de tamanhos maiores, que plantas expostas a pleno sol, assim como plantas com cargas reduzidas (Vaast *et al.*, 2006). Estudos relatam que maior produtividade de uma cultura, bem como, frutos de maiores tamanhos, podem ser conseguidos pela manipulação da relação fonte-dreno. Com isso, submetemos plantas ao tratamento com carga reduzida.

Sabe-se que plantas de tomate com diferentes hábitos de crescimento e frutificação, acumulam quantidades semelhantes de matéria seca, porém, o particionamento de fotoassimilados é afetado (Ho, 1996).

5.2- Acúmulo de açúcares durante o desenvolvimento de frutos de *C. arabica*

Os teores de AST, AR e sacarose foram dosados separadamente em cada tecido: pericarpo, perisperma e endosperma (quando esse já estava presente), em coletas realizadas no ano de 2002/2003 (Fig. 5) e 2003/2004 (Figs. 6, 7 e 8).

Comparando a figura 5 com a figura 6, podemos observar que os perfis nos teores de açúcares não foram exatamente semelhantes nos dois anos de coleta, apresentando diferenças também entre os tratamentos de carga reduzida e

sombreamento, realizados no ano de 2003/2004. Essas diferenças entre os anos de coleta, podem ser explicadas como consequência da bianualidade do cafeeiro, já que as plantas “controle” (ou “pleno sol”) analisadas, apresentaram alta produtividade em 2002/2003 e baixa em 2003/2004 (dados não mostrados). Como consequência da bianualidade, pode ter havido uma competição de carboidratos da parte vegetativa da planta com os frutos, interferindo assim, na relação fonte-dreno.

Nos pericarpos, os maiores acúmulos de AST, AR e sacarose foram encontrados nos últimos estádios de maturação (Figs. 5A, 6A, 7A e 8A). No ano de 2002/2003. O teor de AR no último estágio foi bem mais elevado que o teor de sacarose (Fig. 5A) e no ano seguinte, essa diferença persistiu (Figs. 7A e 8A), nos três tratamentos realizados.

No perisperma, os maiores teores de AST, AR e sacarose foram observados nos estádios iniciais (60 DAF) (Figs. 5B, 6B, 7B e 8B), durante a fase de expansão desse tecido, seguido de uma queda, assim que esse tecido começa a desaparecer, exceto no tratamento com sombreamento, que embora tenha acumulado alto teor de AR nesse estágio, seu maior acúmulo foi num estágio intermediário, aos 150 DAF. O teor de AR no último estágio, assim como no pericarpo foi mais elevado na coleta de 2002/2003 (Fig. 5B) e na coleta de 2003/2004, no controle e no tratamento com sombreamento (Figs. 7B e 8B). No tratamento com carga reduzida, essa diferença nos teores de AR e sacarose não foi notada.

Nos endospermas, os maiores teores de AST observados no ano de 2002/2003, foram no primeiro e último estágio (Fig. 5C), enquanto que, no ano seguinte, os maiores teores foram encontrados nos últimos estágios (Fig. 6C).

Os maiores teores de AR foram observados, nos dois anos de coleta, nos primeiros estágios (Figs. 5C e 7C), decrescendo até os últimos estágios de maturação. O contrário foi visto no teor de sacarose que, que é crescente, com o desenvolvimento do fruto (Figs. 5C e 8C). Os teores mais elevados de AR do que de sacarose, também foi observado nesse tecido nos dois anos de coleta (Figs. 5C, 7C e 8C).

Foi possível observar diferenças quanto ao teor de sacarose no tratamento de sombreamento, em endospermas maduros. O teor de sacarose diminuiu no último estágio aos 260 DAF, sendo menor que o valor acumulado nos últimos estágios de plantas controle e com carga reduzida. Esse resultado confirma o que já foi visto por outros autores (Vaast *et al.*, 2006), que mostram que plantas sombreadas produzem frutos com menor teor de sacarose quando comparadas as expostas a pleno sol. As plantas submetidas a sombreamento produziram frutos que deram bebidas de melhor qualidade, pois alguns atributos positivos, como menor amargura e adstringência, além de maior preferência, foram observados (Vaast *et al.*, 2006).

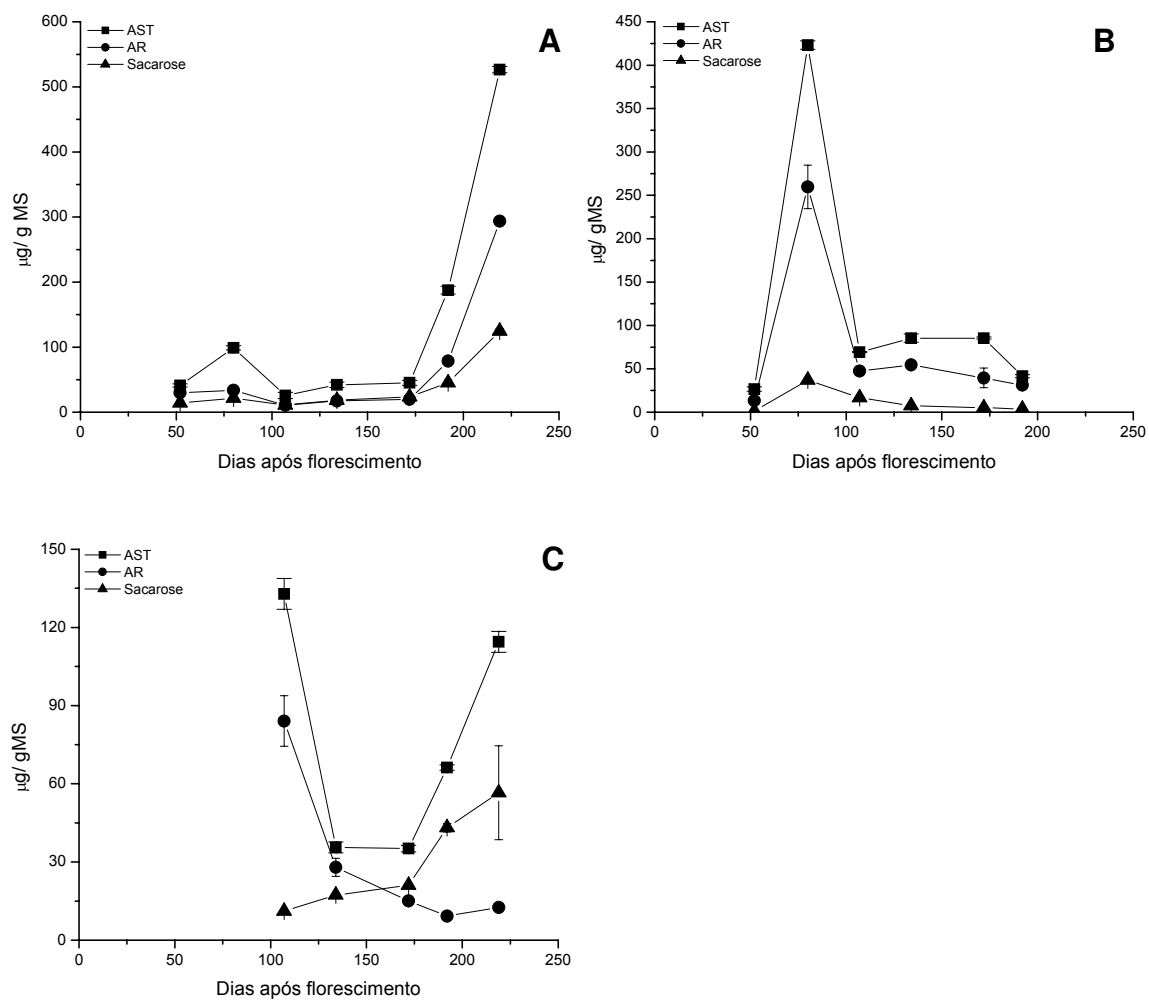


Figura 5: Teores de AST, AR e sacarose nos diferentes tecidos: pericarpo (A), perisperma (B) e endosperma (C), ao longo do desenvolvimento dos frutos de café, no ano de 2002/2003. As barras indicam os desvios padrões, calculados de três repetições.

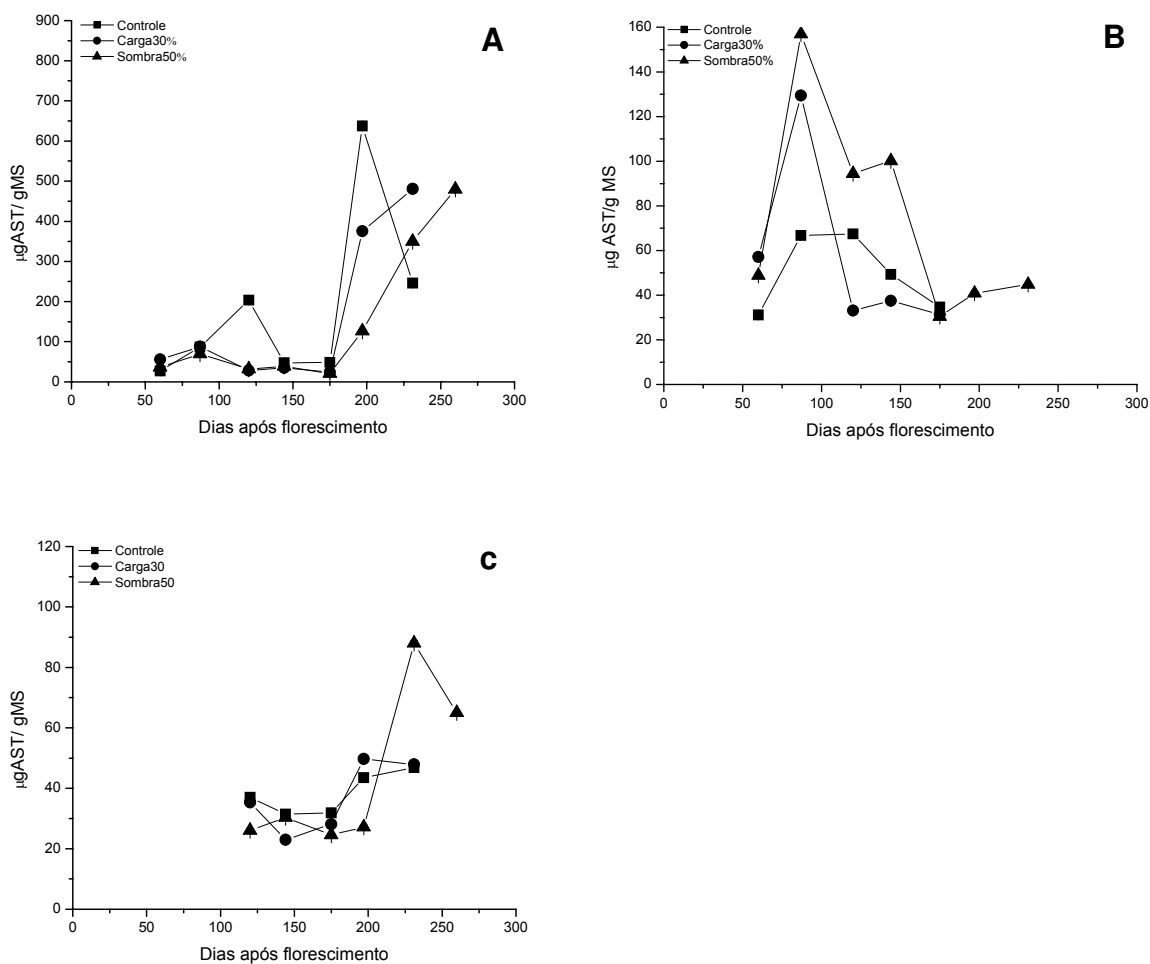


Figura 6: Teores de AST nos diferentes tecidos: pericarpo (A), perisperma (B) e endosperma (C) em diferentes tratamentos, ao longo do desenvolvimento dos frutos de café, no ano de 2003/2004. As barras indicam os desvios padrões, calculados de três repetições.

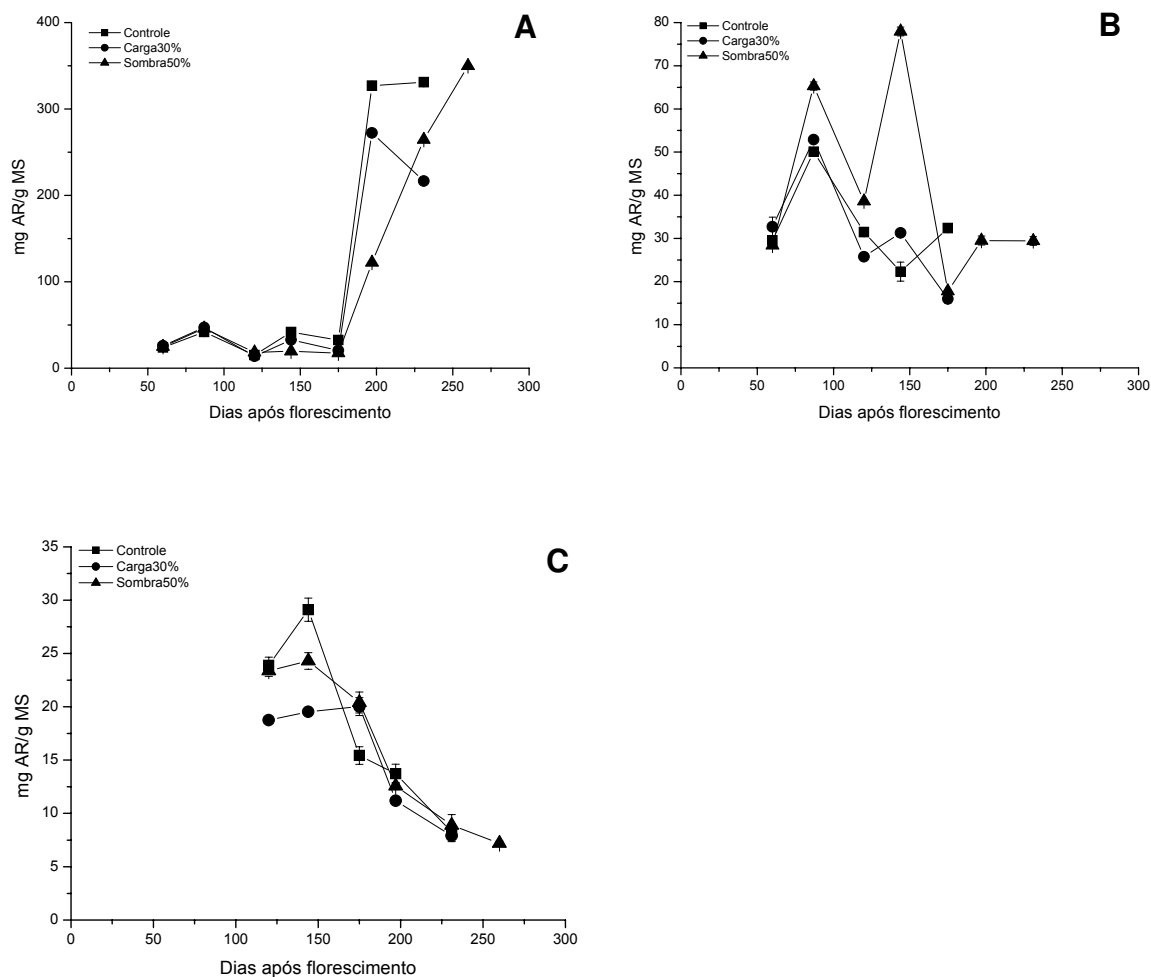


Figura 7: Teores de AR nos diferentes tecidos: pericarpo (A), perisperma (B) e endosperma (C) em diferentes tratamentos, ao longo do desenvolvimento dos frutos de café, no ano de 2003/2004. As barras indicam os desvios padrões, calculados de três repetições.

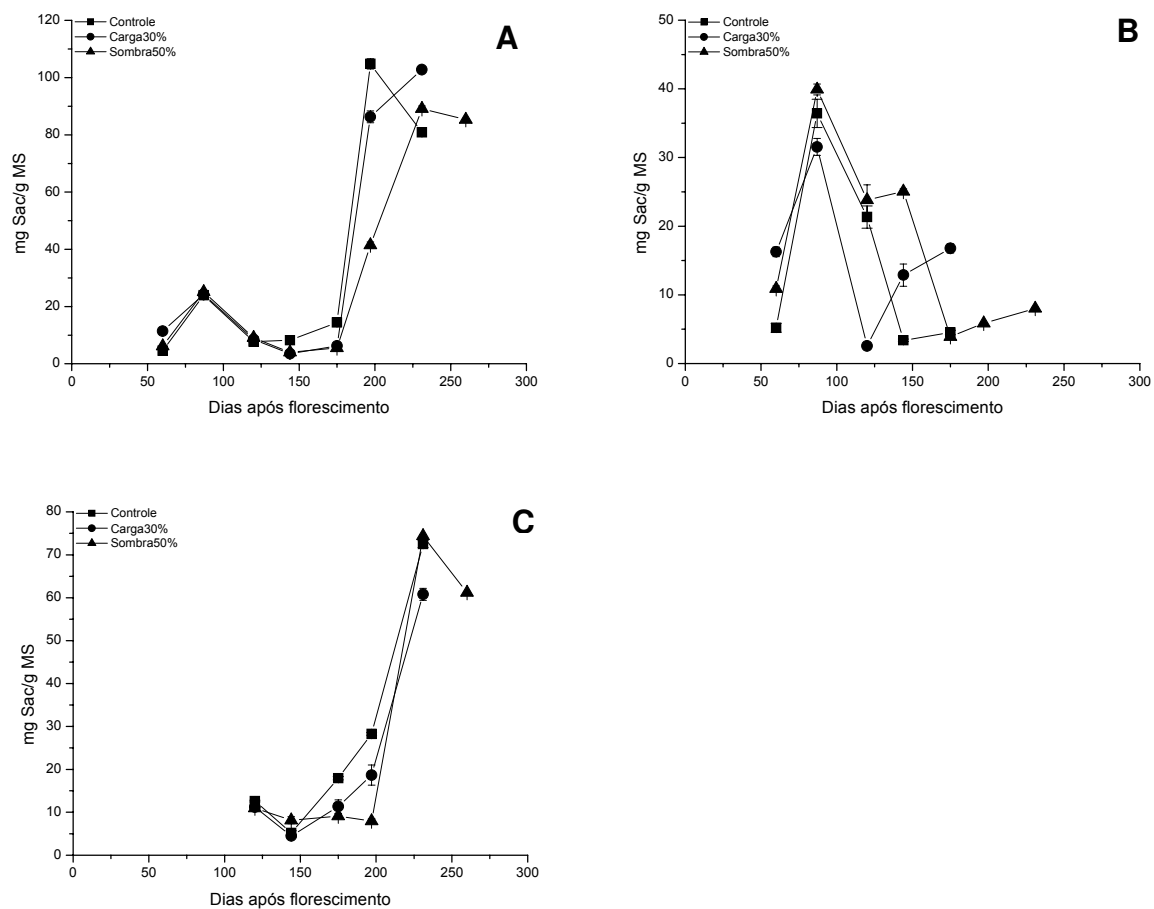


Figura 8: Teores de sacarose nos diferentes tecidos: pericarpo (A), perisperma (B) e endosperma (C) em diferentes tratamentos, ao longo do desenvolvimento dos frutos de café, no ano de 2003/2004. As barras indicam os desvios padrões, calculados de três repetições.

Em plantas superiores, o metabolismo de açúcares mostrou ser essencial para controlar o desenvolvimento de sementes, principalmente na regulação de processos de fonte e dreno (Herbers & Sonnewald, 1998). Por exemplo a maior relação de hexose (H)/sacarose (S) observada em embriões de *Vicia faba* caracteriza a fase de intensa divisão celular (Weber *et al.*, 1998).

A transição para a fase de pré-armazenamento para a fase de armazenamento, onde ocorrem alongamento e diferenciação celular, foi caracterizada por uma clara diminuição da relação H/S. Em órgãos dreno da maioria das espécies de plantas, essas mudanças são controladas por enzimas que degradam e (re)sintetizam a sacarose, respectivamente como as invertases e as SUS e SPS. Os resultados de AR e sacarose, obtidos nos dois anos de coleta, apresentaram perfis semelhantes, exceto para plantas sombreadas. A alta relação H/S no perisperma e endosperma coincidiu com a fase de divisão celular e expansão dos tecidos dos frutos, porém, no pericarpo essa maior relação ocorreu nos últimos estádios. Esse aumento na concentração de AR no pericarpo é atribuído ao amadurecimento, sendo que no fruto, ao passar da cor verde para amarela e depois para vermelho, ocorre hidrólise dos açúcares presentes no pericarpo, onde se encontra 84,2% de água, 8,9% de proteínas e 4,1% de açúcares, sendo que aproximadamente 60% são redutores (Vincent *et al.*, 1985). A medida que o endosperma aparece, a relação H/S diminui no perisperma, exceto em plantas sombreadas, que serão discutidas posteriormente. Maiores teores de AR no perisperma em estádios iniciais do desenvolvimento de frutos, também foram observados por Rogers *et al.* (1999b), possivelmente para diminuir o potencial osmótico do tecido, garantindo o suprimento de água. No endosperma

essa relação diminui entre a fase final de aumento de volume e o início da fase de armazenamento. O alto teor de hexoses parece controlar a expansão do perisperma e endosperma, criando um gradiente de pressão hidrostática, possibilitando o fluxo de massa, com relação a água e nutrientes desses tecidos (Herbers & Sonnewald, 1998). No perisperma, no controle e tratamento com carga reduzida, a maior concentração de AR foi observada aos 89 DAF enquanto a máxima atividade da IAV foi aos 60 DAF, que será mostrada posteriormente. Parte desses AR pode ter vindo da degradação do amido, como sugerido pelos cortes histológicos (Fig. 13D) e não aparentemente da degradação da sacarose importada de folhas e/ou do pericarpo. No endosperma, no início de sua formação, os teores de AR e sacarose podem estar relacionados com a atividade da SUS (que será mostrada posteriormente), pois à medida que diminui o teor de AR, aumenta o de sacarose. Exceto na coleta de 2002/2003, o teor de sacarose foi crescente com o desenvolvimento do endosperma, assim como encontrado por Rogers *et al.* (1999b).

5.3- Atividades de IAV, SUS e SPS em frutos de *C. arabica*

As atividades enzimáticas são mostradas em tecidos separados nos dois anos consecutivos de coleta.

5.3.1- IAV

As atividades de IAV nos diferentes tecidos de frutos de café são apresentadas para os anos de 2002/2003 (Fig. 9A) e de 2003/2004, sendo que no

último período são mostrados os dados de diferentes tratamentos (Figs. 9B, C e D). Elas apresentaram diferenças entre os anos de coletas e também entre os tratamentos.

No pericarpo, as maiores atividades foram observadas no início e no final de desenvolvimento dos frutos, decrescendo no último estágio. As maiores atividades no ano de 2002/2003 foram aos 87 e aos 192 DAF (Fig. 9A). No ano de 2003/2004, os picos de atividades no controle foram aos 120 e aos 197 DAF, no tratamento com carga reduzida, foram observadas aos 87 e 231 DAF, e no tratamento com sombreamento, aos 120 e 231 DAF.

No perisperma, no ano de 2002/2003 (Fig. 9A), as maiores atividades foram no primeiro e último estádios, apresentando um perfil semelhante aos tratamentos com carga reduzida e sombreamento, realizados no ano seguinte (Fig. 9C). No controle em 2003/2004 (Fig. 9C) a maior atividade foi no primeiro estágio e um pequeno pico aos 144 DAF, decrescendo em seguida. A atividade da IAV foi bem mais alta no tratamento com sombreamento no último estágio de desenvolvimento do perisperma (Fig. 9C), mostrando esse tecido, mesmo reduzido a finas camadas de células, desempenha um papel importante no transporte de AR para o endosperma.

No endosperma, exceto no controle de 2003/2004 (Fig. 9D), no qual a atividade aumentou no último estágio, nos demais tratamentos, sombreamento e carga reduzida, e na coleta do ano anterior, 2002/2003 (Figs. 9A e 9D), as atividades da IAV foram maiores no segundo estágio.

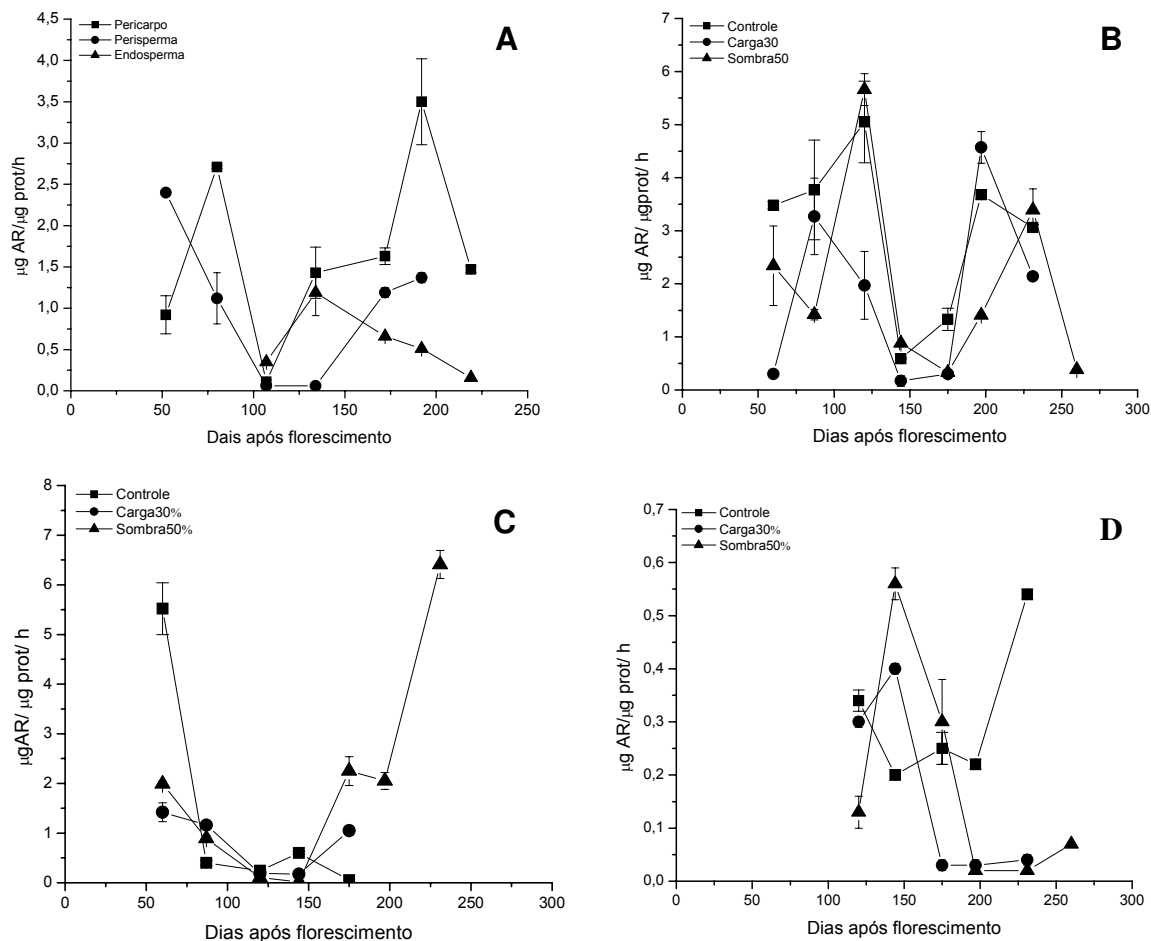


Figura 9: Atividades das IAV, durante o desenvolvimento do fruto de café, em diferentes tecidos, no ano de 2002/2003 (A) e no ano de 2003/2004: no pericarpio (B), perisperma (C) e endosperma (D) com diferentes tratamentos (ver legendas nos gráficos). As barras indicam os desvios padrões, calculados de três repetições.

Com base nos dados de açúcares, o alto teor de AR no pericarpo, nos últimos estádios do desenvolvimento (Fig. 5A e 7A), pode estar relacionado com a alta atividade de IAV, degradando a sacarose a glicose e frutose. No pericarpo, no ano de 2002/2003 e em todos os tratamentos do ano seguinte, houve um acompanhamento da atividade da IAV com ao aumento de AR nos pontos entre 175 a 197 DAF. Porém, essa relação não foi observada nos outros tecidos. Sendo assim, outras isoformas de invertases, como a neutra e a associada à parede celular, podem estar atuando no mesmo momento, além de que outras enzimas de síntese de sacarose podem agir simultaneamente, pois o teor de sacarose continua a aumentar, mesmo com o aumento de AR. O ciclo de degradação e (re)síntese de sacarose, assim como a existência da rápida transferência de açúcares entre os tecidos, pode justificar a falta de relação entre a concentração de AR e atividade da IAV nos demais tecidos.

5.3.2- SUS

5.3.2.1- Duas isoformas de SUS são codificadas por dois genes distintos

Em paralelo ao trabalho apresentado nessa tese, foram também clonadas e seqüenciadas de cDNA os genes *CaSUS1* e *CaSUS2* de *C. arabica*, que codificam para isoformas diferentes de SUS (Geromel *et al.*, 2006). Essas duas seqüências de cDNA foram isoladas utilizando seqüências de ESTs do Projeto Genoma Café (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/café>). O cDNA *CaSUS1* (2979 pb, número de acesso no GenBank: AM087674) foi isolado por RT-PCR de endospermas de frutos de café aos 147 DAF. O cDNA *CaSUS2* (2889 pb, número

de acesso no GenBank: AM087675) foi também isolado por RT-PCR, utilizado-se RNA extraído de frutos de café aos 234 DAF (Geromel *et al.*, 2006).

Mesmo de tamanhos similares, as análises das seqüências primárias de suas proteínas codificadas mostram que são isoformas diferentes de SUS. Assim, a seqüência de aminoácidos de cDNA de *CaSUS1* (806 aminoácidos, massa molecular teórica de 92,5 kDa e ponto isoelétrico de 6,70) mostrou alto grau de similaridade com SUS de dicotiledôneas do grupo SUS1, freqüentemente identificada em órgãos drenos, assim como SUS3 e SUS4 de tubérculos de batata (Fu & Park, 1995) e SUS1 de grãos de ervilha (Déjardin *et al.*, 1997a,b) e em frutos de citrus (Komatsu *et al.*, 2002). A seqüência de aminoácidos obtida pela tradução do cDNA de *CaSUS2* (811 aminoácidos, massa molecular teórica de 92,8 kDa e ponto isoelétrico de 6,57) mostrou alto grau de similaridade com SUS de dicotiledôneas do grupo SUSA, assim como SUSA de *Citrus unshiu* (Komatsu *et al.*, 2002). Esta proteína também mostrou relativamente alta identidade (82%) e homologia (90%) com a proteína SS2 codificada do gene *CpSS2* (AJ132000) da planta *Craterostigma plantagineum* (Kleines *et al.*, 1999). Os dois cDNA foram utilizados como sondas específicas para detectar a expressão dos genes correspondentes (Northern-blot, Fig. 10) nos diferentes tecidos e estádios de desenvolvimento.

5.3.2.2 Atividades de SUS no fruto de café

As atividades da SUS foram dosadas *in vitro* no sentido de síntese de sacarose e são apresentadas nas figuras 10 (A e B) e 11 (A, B, C e D) nos anos de 2002/2003 e 2003/2004, respectivamente. No ano de 2003/2004, as

expressões dos genes foram analisadas apenas nos endospermas e a detecção do gene *CaSUS1*, pela técnica de Western-blot , apenas nos endospermas de plantas controle.

No pericarpo, a maior atividade da SUS, no ano de 2002/2003 foi observada no último estágio, sendo crescente até esse ponto (Fig. 10A), sendo o mesmo observado para os de plantas de tratamento de carga reduzida (Fig. 11A) do ano seguinte. No controle, a atividade foi crescente até o penúltimo estágio, onde atingiu a máxima atividade e decrescendo em seguida (Fig. 11A), porém no tratamento com sombreamento houve uma variação grande ao longo do desenvolvimento do fruto. No ano de 2002/2003 (Fig. 10A), a atividade da SUS no pericarpo coincide com a expressão do gene *CaSUS2*, que é detectada no último estágio, ao contrário da expressão do gene *CaSUS1*, que foi detectada na fase inicial e intermediária do desenvolvimento do fruto. As atividades da SUS foram sempre muito mais altas que as da IAV.

No perisperma, as maiores atividades de SUS foram no final do desenvolvimento. No ano de 2002/2003, a maior atividade foi no penúltimo estágio (Fig. 10A), assim como em plantas sombreadas (Fig. 11C) (2003/2004) e em plantas controle e com carga reduzida (Fig. 11B), as maiores atividades foram detectadas no último estágio (Fig. 11C). No perisperma os dois genes se expressaram no início do desenvolvimento, mas a expressão de *CaSUS2* também foi detectada no último estágio, também coincidindo com a atividade enzimática. A expressão do gene *CaSUS1* nos estádios iniciais pode estar relacionada com a síntese de amido nessa fase no perisperma, como foi sugerido anteriormente nos cortes histológicos. Alguns autores sugerem que uma das funções da SUS é

direcionar a sacarose para síntese de amido em tecidos de armazenamento (Chourey & Nelson, 1976; Claussen *et al.*, 1985; Doehlert, 1990).

No endosperma, no ano de 2002/2003 (Fig. 10A) a atividade da SUS foi crescente até o último estágio, como no pericarpo. Em 2003/2004, todos os tratamentos apresentaram um pico de atividade aos 195 DAF (Fig. 11C) e no controle e tratamento com carga reduzida, houve um decréscimo até o último estágio, enquanto que, no tratamento com sombreamento, após os 195 DAF houve um acréscimo até o final da maturação, apresentando a máxima atividade. O gene *CaSUS1* foi expresso sempre nos primeiros estádios de desenvolvimento do endosperma (Figs. 10B e 11D), enquanto o gene *CaSUS2* foi expresso no final. No experimento de Western-blot (Fig. 14 A,w) a detecção da proteína SUS foi também nos primeiros estádios. Nesse experimento foi usado anticorpos contra a principal isoforma de SUS de tegumentos de ervilha, provavelmente correspondendo ao produto do gene *PsSUS1* (GB número de acesso AJ012080).

A atividade enzimática de SUS no pericarpo no ano de 2002/2003, nos estádios finais de maturação, foi acompanhada pela detecção da expressão do gene *CaSUS2*, e também pelo acúmulo de sacarose nesse tecido. O mesmo foi observado nos endospermas de plantas submetidas aos tratamentos de carga reduzida e sombreamento, no ano seguinte (2003/2004), onde foram observadas maiores atividades no último estágio de maturação, assim como a expressão do gene *CaSUS2* e o acúmulo de sacarose, nesses tecidos. Foi observado nos pericarpos de plantas controle e carga reduzida (2003/2004) que as atividades enzimáticas da SUS também acompanharam o acúmulo de sacarose, porém essa

relação não foi vista nos pericarpos de plantas submetidas ao sombreamento, mostrando que a sombra influenciou bastante a atividade dessa enzima.

Relacionando-se os dados de atividades enzimáticas, expressões dos genes *CaSUS1* e *CaSUS2* e o acúmulo de sacarose nos diferentes tecidos dos frutos de café, é provável que esses genes codifiquem isoformas de SUS que desempenham diferentes funções dentro das células.

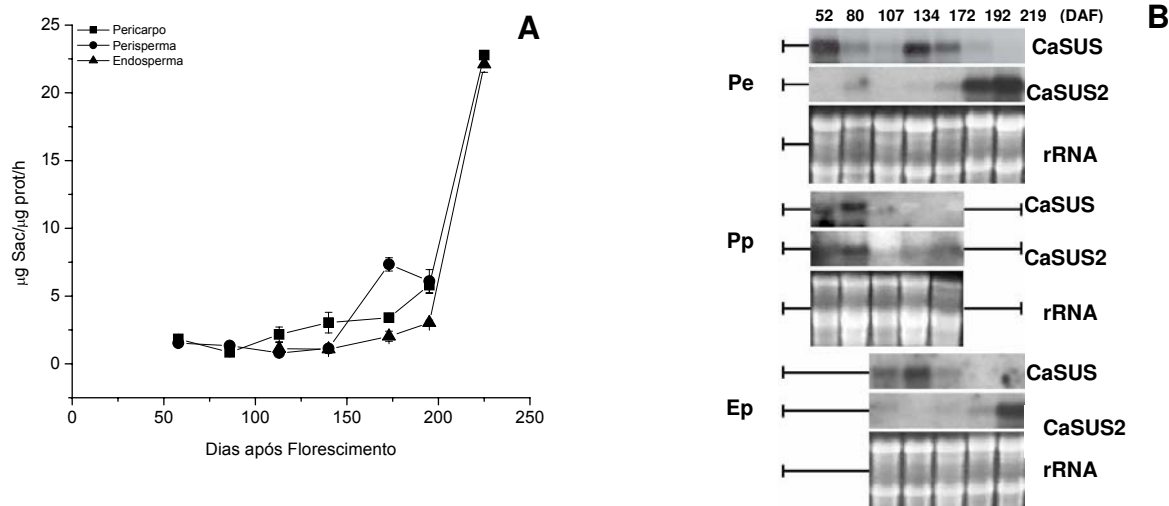


Figura 10: Atividades enzimáticas da SUS (A) e a expressão (Northern-blot) dos genes *CaSUS1* e *CaSUS2* (B), nos diferentes tecidos (Pe: pericarp, Pp: perisperma e Ep: endosperma) durante o desenvolvimento dos frutos de café, no ano de 2002/2003. As barras indicam os desvios padrões, calculados de três repetições.

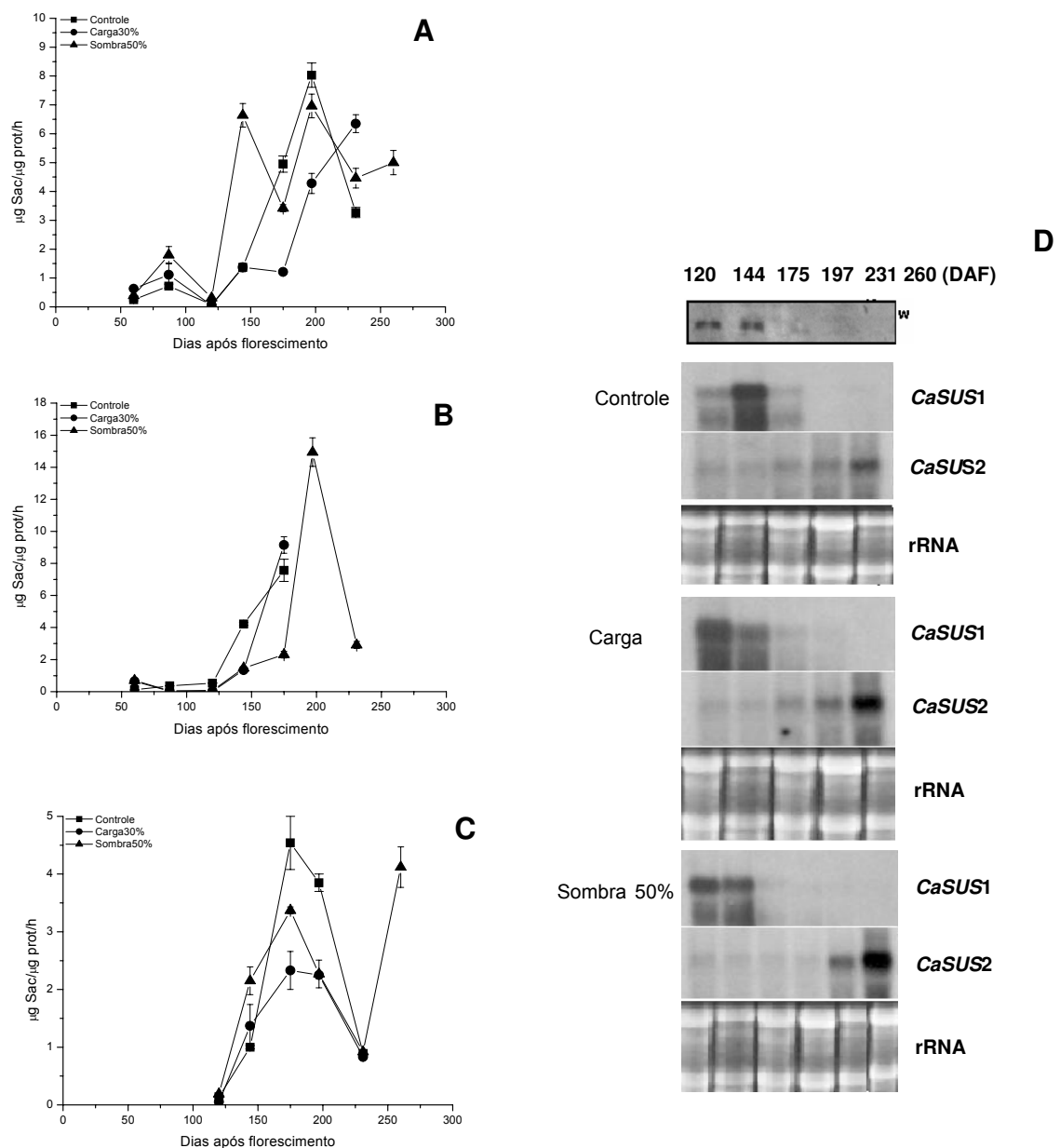


Figura 11: Atividades enzimáticas da SUS no pericarpo (A), perisperma (B) e endosperma (C) ,nos diferentes tratamentos no ano de 2003/2004. As barras indicam os desvios padrões, calculados de três repetições. Expressões (Northern-blot) dos genes *CaSUS1* e *CaSUS2* nos endospermas de frutos de café e Western-blot (w) de endospermas de plantas controle (D) também são apresentadas. As barras indicam os desvios padrões, calculados de três repetições.

5.3.3- SPS

As atividades enzimáticas da SPS são apresentadas na figura 12 de frutos de café coletados no ano de 2003/2004.

As atividades da SPS nos pericarpos (Fig. 12A) apresentaram uma grande variação ao longo do desenvolvimento dos frutos, apresentando dois principais picos de atividades, um no início e outro no final, porém no tratamento com sombreamento a atividade aumentou no último estágio, ao contrário dos demais tratamentos. Ao contrário da SUS, a atividade da SPS nesse tecido, acompanhou o acúmulo de sacarose nos estádios iniciais. Até os 87 DAF há um aumento da atividade (Fig. 12A), seguido de um decréscimo até o estágio seguinte (120 DAF), o mesmo ocorrendo com a sacarose nesses mesmos períodos. Isso pode ser observado nos três tratamentos realizados.

No perisperma não houve muitas diferenças entre os três tratamentos (Fig. 12B), porém nesse tecido a atividade SPS não foi acompanhada pelo acúmulo de sacarose.

No endosperma, os perfis de atividades foram diferentes entre os tratamentos (Fig. 12C). No controle, a maior atividade foi no segundo estágio, no tratamento com carga reduzida, foi aos 197 DAF e no tratamento com sombreamento, no último estágio. Nesse tecido, também não foi observado nenhuma relação da atividade dessa enzima com o acúmulo de sacarose.

Ainda que a SPS esteja envolvida na ressíntese de sacarose, as atividades não acompanham o acúmulo de sacarose nos tecidos, exceto no estágio inicial do desenvolvimento do pericarpo. Embora muitos trabalhos associem o aumento da atividade da SPS com o acúmulo de sacarose, como visto durante o

amadurecimento em tomate, pêssego e manga (Hubbard *et al.*, 1991), o mesmo não foi observado em café. Entretanto, elas coincidiram temporariamente com a síntese da proteína 11S (Rogers *et al.*, 1999a) e o início de acúmulo de polissacarídeos (Redgwell *et al.*, 2003) e a atividade da galactosidase (Marraccini *et al.*, 2005), essencial para deposição de galactomananos na parede celular do endosperma. A atividade da SPS, detectada aqui, parece estar relacionada com a diferenciação do endosperma em tecidos de armazenamento, como visto durante o desenvolvimento de *Vicia faba* (Weber *et al.*, 1996).

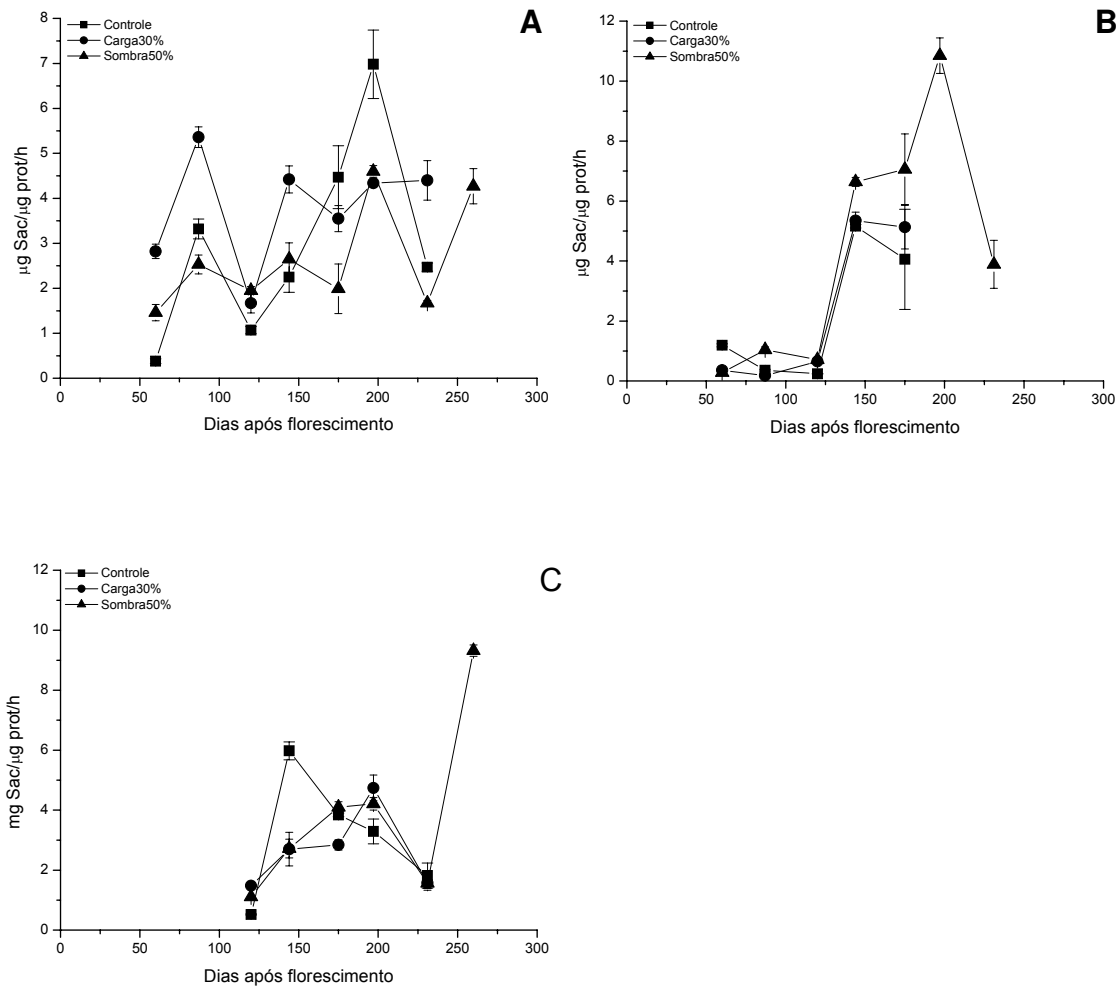


Figura 12: Atividades da SPS durante o desenvolvimento do grão de café no pericarpo (A), perisperma (B) e endosperma (C) do ano de 2003/2004. As barras indicam os desvios padrões, calculados de três repetições.

5.4- Estudo histológico em frutos de *C. arabica*

As sementes de café apresentam desenvolvimento e organização histológica bastante peculiar (De Castro & Marraccini, 2006). Na grande maioria das plantas, dificilmente o perisperma atinge o grau de desenvolvimento como visto em café e acredita-se que ele ajude no armazenamento de água para o desenvolvimento do endosperma (Rogers *et al.*, 1999b)

No início do desenvolvimento da semente de *C. arabica*, aos 40 DAF foi possível observar que o perisperma constitui o tecido predominante, ocupando todo espaço interno da semente (Fig. 13A). Os feixes vasculares percorrem o funículo terminando na região da calaza sem penetrar no perisperma (Fig. 13A) e também não tendo contato com o endosperma (Fig. 13C). Aos 60-75 DAF já é possível visualizar a formação do endosperma (Fig. 13B) e com o desenvolvimento da semente, o endosperma se torna o principal tecido, passando a ocupar o espaço antes ocupado pelo perisperma. Nas sementes maduras, as células do perisperma colapsam e ficam restritas a poucas camadas de células (2 ou 3), que conjuntamente passam a ser denominadas de “película prateada”, circundando o endosperma (Fig. 13C).

Na figura 13D, a reação com Lugol mostrou que apenas células do perisperma (60-75 DAF) são ricas em grãos de amido. Com o crescimento da semente, os grãos de amido foram desaparecendo do perisperma nas camadas localizadas próximas ao endosperma, sugerindo que o amido seja hidrolisado nessas regiões para, por exemplo, suprir a energia necessária ao crescimento do endosperma. O desaparecimento dos grãos de amido pode explicar os picos de

AR detectados no perisperma nesse ponto, nos dois anos de coleta (Figs. 5B e 6B).

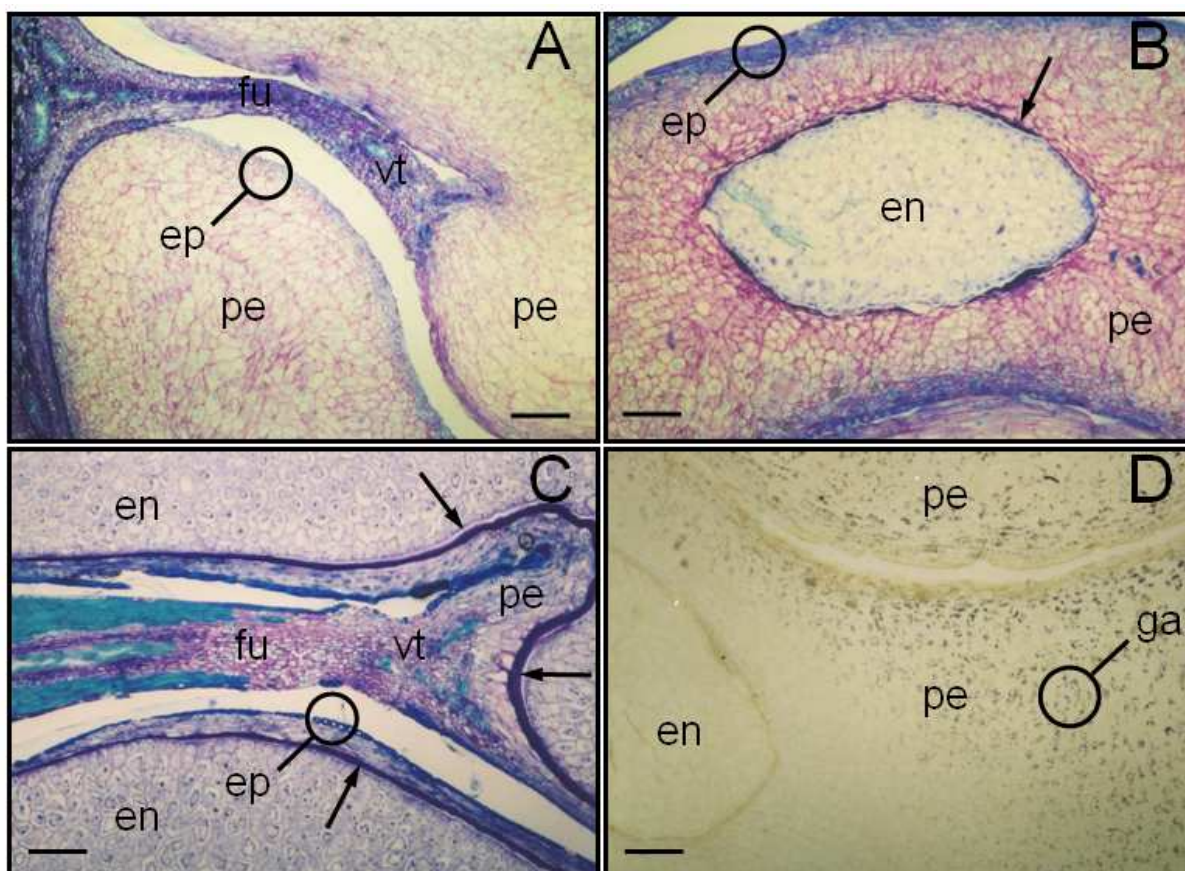


Figura 13: Cortes histológicos de sementes de *C. arabica* em diferentes estádios de desenvolvimento. Sementes com aproximadamente 40 DAF (A), 60-75 DAF (B e D) e 205-234 DAF (C) foram coradas e após os cortes foi possível observar: perisperma (pe), endosperma (en), feixe vascular (vt), funículo (fu), epiderme (ep) e grão de amido (ga). Barras = 200 μ m em A, B e D e 80 μ m em C.

Após o florescimento, com o desenvolvimento da semente, as células do nucelo multiplicam-se ativamente, dando origem ao perisperma, que é um tecido maternal diplóide e transitório (Mendes, 1941). Em uma fase posterior do desenvolvimento da semente, o espaço antes ocupado pelo perisperma, passa a ser ocupado pelo endosperma, que representará mais que 95% da massa da semente formada e o perisperma passa, então, a ser representado por 2 a 3 camadas de células, sendo denominada de “película prateada” (Mendes, 1941).

Uma semente morfologicamente madura de café consiste de uma massa grande de endosperma envolvida por uma “película prateada”, o perisperma, e um pequeno embrião. Como mostrado acima, os vasos condutores não penetram no perisperma, mas possuem contato e alguns autores sugerem que há um descarregamento simplástico de fotoassimilados diretamente para o perisperma seguido de difusão no interior desse tecido (Patrick & Offler, 1995). Como não foram observadas as conexões vasculares entre o perisperma e o endosperma, acredita-se que a transferência de açúcares entre estes tecidos, seja apoplástica.

O perisperma é mencionado como um tecido capaz de fornecer ao endosperma, alguns precursores como ácidos orgânicos para a síntese de ácido clorogênico (Rogers *et al.*, 1999b).

5.5- Ensaios com radioisótopos em *C. arabica*: fornecimento de ^{14}C

Ramos com folhas e frutos de café com aproximadamente 120 DAF foram incubados com $^{14}\text{CO}_2$, e a radioatividade foi determinada em tecidos separados (Fig. 14A). Quando a incubação foi feita com frutos, quantidades relevantes de radioatividade permaneceram no pericarpo, mostrando a importância desse tecido

na mobilização de açúcares no fruto de café, mas também uma significativa parte da radioatividade foi acumulada no perisperma e endosperma. Quando o $^{14}\text{CO}_2$ foi fornecido para as folhas, o acúmulo de radioatividade encontrada no pericarpo foi baixa, quando comparado com os outros tecidos. O perisperma foi o que apresentou maior acúmulo de radioatividade. Isto sugere que de fato, o pericarpo é capaz de realizar fotossíntese, não precisando importar (ou importando pouco) das folhas, e que quando, vindo das folhas, a sacarose transportada parece ser descarregada preferencialmente no perisperma. Vaast *et al.* (2005) estimaram que a fotossíntese feita pelo pericarpo pode contribuir com 30% do carbono total alocado no fruto. Em ambas as medidas, o acúmulo de radioatividade detectada no perisperma mostrou a importância desse tecido no transporte de açúcares nos frutos de café

No segundo experimento, no qual foram fornecidas ^{14}C -sacarose e ^{14}C -frutose, os resultados são apresentados nas figuras 14 (B, C e D) e ilustram a complexidade do metabolismo de açúcar no fruto de café. Em ambos os casos, maiores níveis de radioatividade foram encontrados no pericarpo, devido à maneira de aplicação do ^{14}C , que foi via pedúnculo, atingindo preferencialmente os vasos pertencentes ao pericarpo. Na figura 14B foi possível observar que houve transferência de radioatividade entre pericarpo, perisperma e endosperma, visto que este último tecido não tem contato com vasos condutores. Quando o produto aplicado foi ^{14}C -sacarose (Fig. 14C), o maior teor de radioatividade específica, foi em sacarose e no pericarpo do fruto, em quantidade bastante superior radioatividade específica em AR. Quando aplicada ^{14}C -frutose (Fig. 14D) a maior radioatividade específica foi encontrada no pericarpo de extrato de AR.

Esse experimento nos permite estudar como esses açúcares são metabolizados em cada tecido, confirmando que o perisperma é um tecido de transferência, pois acumulou quantidade significativa de radioatividade, a qual foi transferida para o endosperma (Fig. 14B). A transferência de sacarose e frutose marcada do pericarpo para o perisperma e endosperma, sendo metabolizados em AR e sacarose, respectivamente (Fig. 14C e D), indicou que havia uma atividade simultânea de síntese e degradação de sacarose nos três tecidos, evidenciando a complexidade do metabolismo de açúcar no fruto de café. É também interessante observar que quando a ^{14}C -sacarose foi fornecida, o perisperma apresentou maior radioatividade específica nos extratos de sacarose e AR, comparada com a radioatividade específica nos mesmos extratos detectado no endosperma (Fig. 14C). Em situação oposta, foi observado que quando os frutos receberam ^{14}C -frutose, o endosperma apresentou nos extratos de sacarose e AR, radioatividade específica maior que no perisperma, indicando a existência da conversão ativa de AR para sacarose nesse tecido (Fig. 14D).

No terceiro experimento, frutos em diferentes estádios de desenvolvimento foram coletados e incubados com $^{14}\text{CO}_2$ (Fig. 14E), mostrando que a contribuição do pericarpo para assimilação de $^{14}\text{CO}_2$ diminuiu gradativamente com a maturação do fruto e que mesmo durante o desaparecimento do perisperma ao longo do desenvolvimento do fruto, esse tecido desempenha a função de tecido de passagem. A fotossíntese do fruto também decresce com a maturação, apontado pelo decréscimo gradual de radioatividade encontrada em todos os tecidos, principalmente no pericarpo. Independente da rota usada para transporte de

sacarose entre os diferentes tecidos dos frutos de café, estes experimentos destacam a existência de trocas de açúcares entre compartimentos do fruto.

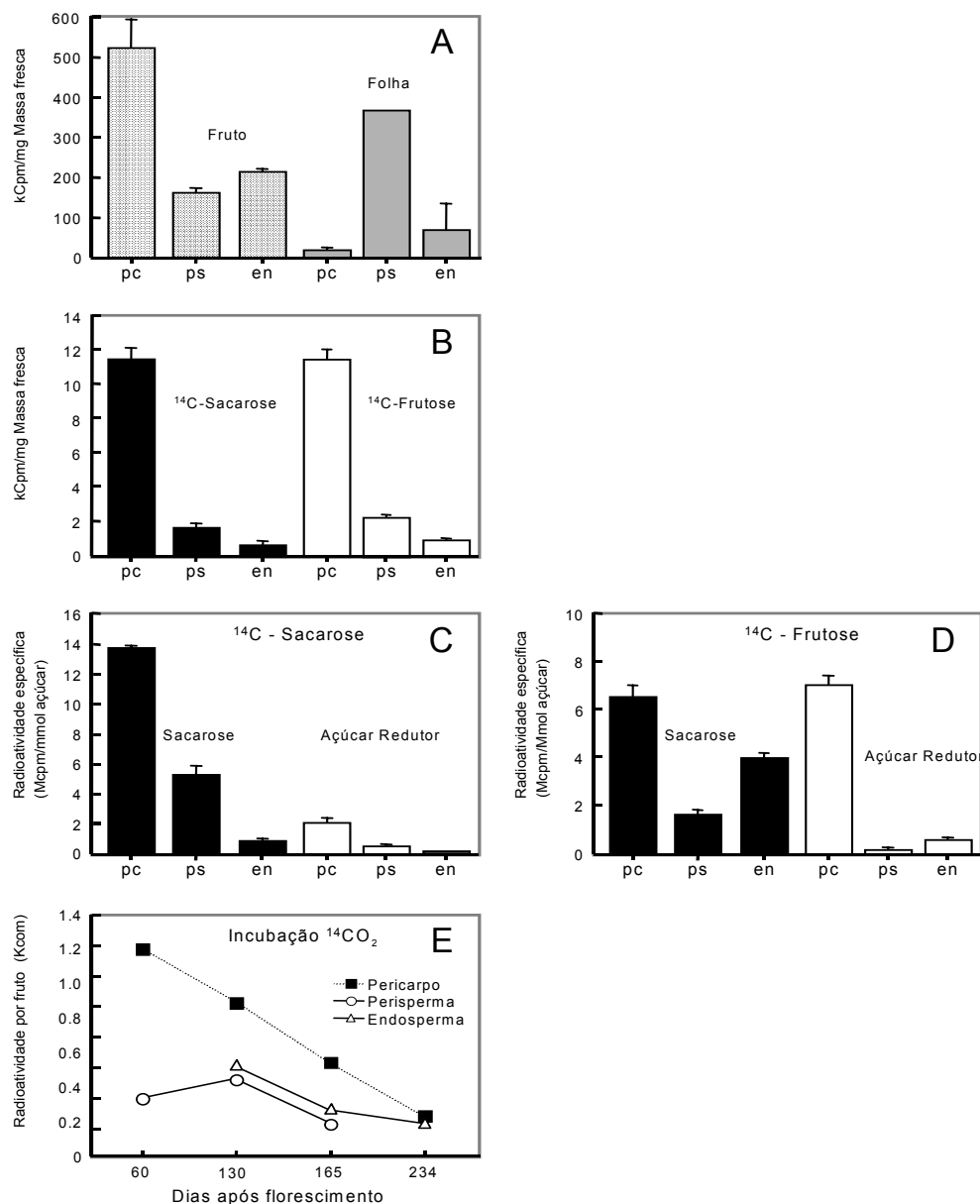


Figura 14: Análise do metabolismo e transporte de sacarose em frutos de café incubados com soluções de ^{14}C . Radioatividade incorporada em folhas e frutos de café aos 120 DAF expostos a $^{14}\text{CO}_2$, por 24h e medida no pericarpo (pc), perisperma (ps) e endosperma (en) dos frutos (A). Radioatividade incorporada em frutos, aos 120 DAF após incubações com soluções de ^{14}C - sacarose e ^{14}C -frutose e a radioatividade medida em cada tecido (B). Radioatividade específica encontrada em cada tecido, nos extratos de AR e sacarose, quando aplicados ^{14}C – sacarose (C) e ^{14}C – frutose (D). Distribuição da radioatividade em frutos de café coletados em 4 estádios de desenvolvimento e a dosagem da radioatividade específica no pc, ps e en dos frutos.

5.6- Atividades enzimáticas e expressão dos genes *SUS1* e *SUS2* em frutos de *C. racemosa*

Esse experimento teve como principal objetivo analisar as mesmas enzimas, açúcares e genes, observados em *C. arabica*, e comparar os dados obtidos com esta duas espécies.

A figura 15 apresenta a massa fresca nos frutos (Fig. 15A) e porcentagem de massa fresca nos diferentes tecidos dos frutos de *C. racemosa* (Fig. 15B), as atividades das enzimas IAV (Fig. 16A), SUS e a expressão dos genes *SUS1* e *SUS2* (Fig. 16B) e os teores de AR e sacarose (16C), nos endospermas dos frutos ao longo do desenvolvimento.

Os frutos de *C. racemosa* completaram seu ciclo de desenvolvimento aproximadamente aos 70 DAF, confirmando ter um ciclo bem mais curto que o de *C. arábica*. Também, os frutos dessa espécie apresentaram o mesmo padrão da curva de crescimento, tanto para o fruto inteiro como para o endosperma, quando comparado com os de *C. arabica*. A primeira coleta foi realizada aos 15 DAF e o endosperma separado aos 27 DAF. Embora o ciclo de desenvolvimento dessa espécie seja mais rápido, ela apresenta tamanho reduzido tanto de grão como de endosperma. A massa fresca do fruto é, aproximadamente, quatro vezes menor, e do endosperma, aproximadamente 7 vezes menor (Fig. 15B) quando comparado com *C. arabica*. Outra característica dessa espécie é a porcentagem de massa fresca do pericarpo no final do desenvolvimento do fruto (Fig. 15B), que é quase oito vezes maior que a do endosperma, diferente de *C. arabica*, que possui uma relação menor entre esses tecidos.

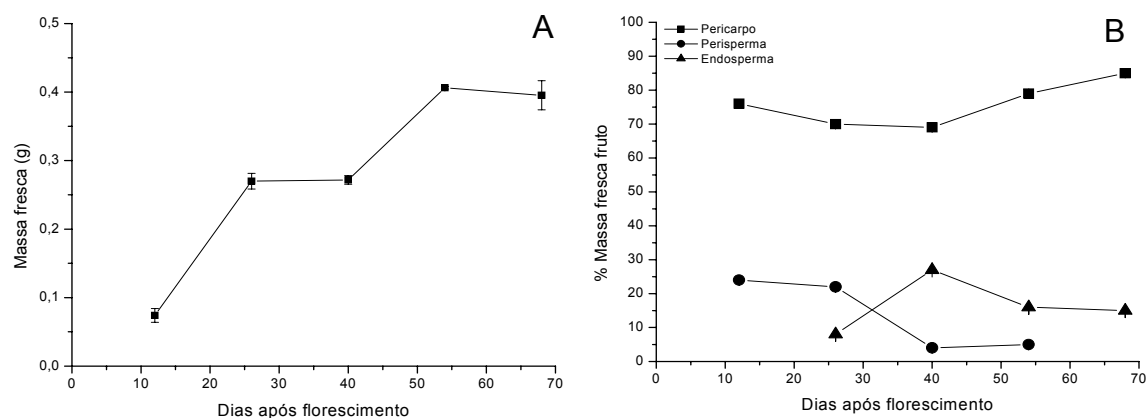


Figura 15: Massa fresca de frutos de *C. racemosa* (A) e porcentagem de massa fresca em diferentes tecidos dos frutos (B), ao longo do desenvolvimento. As barras indicam os desvios padrões, calculados de três repetições.

A atividade da IAV (Fig. 16A) mostrou ser maior no primeiro e no último estádios e nos estádios intermediários apresentou-se baixa e constante. Essa maior atividade no primeiro estágio é acompanhada pelo alto teor de AR, o que, a princípio nos leva a pensar que esses AR são oriundos da degradação da sacarose, por ação dessa enzima. A atividade da SUS (Fig. 16B) apresentou um pico no segundo estágio e decresceu em seguida, tendo uma atividade no último estágio semelhante ao primeiro. Porém, quando comparamos os valores de IAV com os de SUS, podemos observar que as de SUS são bem maiores, como

também observado em *C. arabica*, com isso, mesmo quando a IAV atinge suas atividades mais elevadas, como no primeiro e último estádios, o valor da atividade da SUS continua sendo maior, o que nos faz desconsiderar que os AR observados no primeiro estágio tenha vindo da degradação da sacarose por ação da IAV, mas possivelmente pela SUS.

O mesmo perfil foi visto na expressão do gene *SUS1* (Fig. 16B), que mostrou maior expressão no segundo e no terceiro estádios de desenvolvimento. A expressão do gene *SUS2* (Fig. 16B) foi diferente, mostrando maior expressão no último estágio de desenvolvimento do fruto, assim como foi visto em *C. arabica*. Os cDNAs *CaSUS1* e *CaSUS2* usados como sondas, reconheceram mRNAs em *C. racemosa*, o que significa, que as seqüências desses genes são conservadas nessas duas espécies. O pico da SUS no segundo estágio coincide exatamente com o maior teor de sacarose (Fig. 16C) e quando o endosperma apresenta maior porcentagem de massa fresca, podendo fornecer sacarose ou AR. Em *C. arabica*, acreditamos que o gene *CaSUS1*, com base nos dados obtidos, esteja envolvido na degradação de sacarose, enquanto que em *C. racemosa*, esse gene pode estar relacionado com a síntese da sacarose, pois no mesmo ponto onde há alta atividade enzimática de SUS, há também maior teor de sacarose e a expressão do gene *SUS1* foi fortemente detectado, ao contrário do gene *SUS2*.

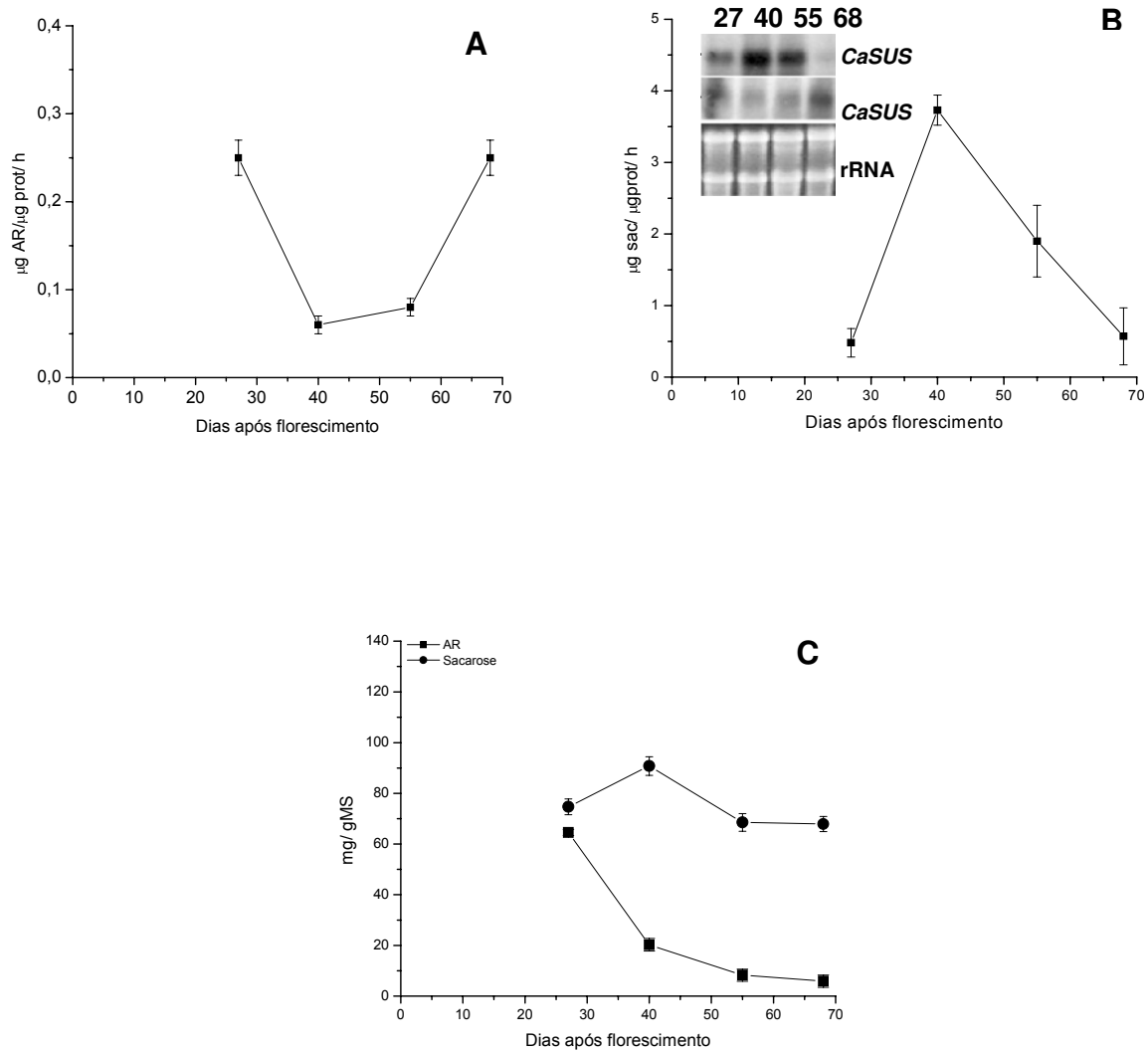


Figura 16: Atividades enzimáticas da IAV (A) e SUS (B) e teores de AR e sacarose (C) em endospermas de frutos de *C. racemosa* em diferentes estádios de desenvolvimento. As expressões dos genes *SUS1* e *SUS2* nos endospermas de *C. racemosa* são também apresentadas em (B). As barras indicam os desvios padrões, calculados de três repetições.

6- CONCLUSÕES

Por ser o primeiro trabalho detalhado sobre o metabolismo de açúcar ao longo do desenvolvimento do fruto de café, fica clara a complexidade ao relacionar os acúmulos de açúcares, atividades enzimáticas, expressões dos genes, a importância, as conexões e as transferências entre os tecidos.

Pelos dados obtidos nos experimentos de histologia e transferência de compostos marcados, podemos concluir que o pericarpo além de realizar fotossíntese e esta diminuir com o desenvolvimento do fruto, também pode receber fotoassimilados das folhas. O perisperma além de receber fotoassimilados do pericarpo, pode também receber direto das folhas e transferir para o endosperma. É claro também, que a função do perisperma não está limitada apenas no acúmulo transitório e transferência de precursores bioquímicos para o endosperma, pois teve a capacidade de transcrever genes e apresentar altas atividades enzimáticas, como a da IAV em pericarpo de frutos de plantas sombreadas, translocando AR para o endosperma, mesmo quando reduzido a finas camadas, confirmando a importante função desse tecido no desenvolvimento do fruto de café.

Com base nos dados enzimáticos e acúmulo de açúcares, fica evidente que é de grande complexidade o desdobramento de fotoassimilados nos tecidos dos frutos, pois as enzimas chave, como invertases, SUS e SPS, agem simultaneamente, sintetizando e degradando a sacarose. Visto que as atividades de SUS foram sempre mais elevadas que as de IAV, mesmo quando essa apresentava sua máxima atividade, possivelmente a SUS tem um controle maior no desdobramento de sacarose no fruto de café, não só de *C. arabica* como

também de *C. racemosa*. A SPS também pode estar atuando na síntese de sacarose , pois atingiu valores semelhantes aos de SUS e acompanha o acúmulo de sacarose no pericarpo de frutos de *C. arabica*, nos estádios iniciais.

Duas isoformas de SUS foram identificadas e possivelmente desempenham diferentes funções metabólicas dentro da célula, sendo os genes *CaSUS1* e *CaSUS2*. Esses genes não se expressam ao mesmo tempo nos tecidos, parecendo claro que, em *C. arabica*, o gene *CaSUS2* está relacionado com a síntese de sacarose, pois sua forte expressão, se sobrepõe aos picos de SUS e acúmulo de sacarose, em determinados estádios do pericarpo e endosperma, enquanto o gene *CaSUS1*, parece estar relacionado com a degradação de sacarose. Em *C. racemosa*, os genes *SUS1* e *SUS2*, parecem desempenhar funções diferente daquelas observadas em *C. arabica*. A forte expressão do gene *SUS1*, foi detectada no endosperma, no mesmo ponto onde houve máxima atividade enzimática da SUS e maior acúmulo de sacarose, parecendo assim, estar relacionado com síntese de sacarose.

Observamos que os tratamentos realizados influenciaram no desenvolvimento e metabolismo dos frutos. A luz influenciou no ciclo de desenvolvimento dos frutos, estendendo-o e alterando o acúmulo de sacarose e as atividades das enzimas IAV, SUS e SPS, ao longo do desenvolvimento do fruto.

7- PERSPECTIVAS

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho, existe o interesse de se dar continuidade ao estudo do metabolismo de sacarose nos frutos de café, pois se sabe, agora, que além da SUS estar envolvida na síntese de sacarose, a SPS, ao contrário da IAV, pode também controlar o desdobramento da sacarose em determinado tecido e estágio de desenvolvimento do fruto, além da possível participação de outras invertases, com a ácida, associada à parede celular.

Além de *C. arabica*, seria interessante estudar também o metabolismo de sacarose em *C. canephora*, pois os teores de sacarose variam bastante entre essas espécies (*C. arabica*: 8-12% e *C. canephora*: 2-6% na massa seca).

Outra perspectiva muito interessante é utilizar o conhecimento gerado pelos dados obtidos nesse trabalho para explorar os mecanismos que regulam os tamanhos de frutos em *C. arabica*, uma vez que em algumas espécies esta característica pode estar associada ao acúmulo de açúcares.

Finalmente, outra perspectiva que se abre é o uso das informações obtidas na parte molecular deste estudo, para a seleção de plantas que acumulem mais sacarose, uma vez que este açúcar parece desempenhar papel fundamental na forma da qualidade do café.

8- BIBLIOGRAFIA

- Amor, Y.; Haigler, C.H.; Johnson, S.; Wainscott, M. & Delmer, D., 1995. A membrane associated form of sucrose synthase and its potential role in the synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9353-9357.
- Andersen, M.N.; Asch, F.; Wu, Y.; Jensen, C.R.; Naested, H.; Mogensen, V.O. & Koch, K.E., 2002. Soluble invertase expression is an early target of drought stress during the critical, abortion-sensitive phase of young ovary development in maize. *Plant Physiol.* 130: 591-604.
- Asano, T.; Kunieda, N.; Omura, Y.; Ibe, H.; Kawasaki, T.; Takano, M.; Sato, M.; Furuhashi, H. & Takaiwa, F., 2002. Rice SPK, a calmodulin-like domain kinase, is required for storage product accumulation during seed development: phosphorylation of sucrose synthase is a possible factor. *Plant Cell* 14: 619-628.
- Barrat, D.H.P.; Barber, L.; Kruger, N.J.; Smith, A.M.; Wang, T.L. & Martin, E., 2001. Multiple, distinct isoforms of sucrose synthase in pea. *Plant Physiol* 127: 655-664.
- Borisjuk, L.; Rolletschek, H.; Wobus, U. & Weber, H., 2003. Differentiation of legume cotyledons as related to metabolic gradients and assimilate transport into seeds. *J. Exp. Bot.* 54: 503-512.

- Bradford, M.N., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Campa, C.; Ballester, J.F.; Doulebeau, S.; Dussert, S.; Hamon, S. & Noirot, M., 2004. Trigonelline and sucrose diversity in wild *Coffea* species. *Food Chem.* 88: 39-44.
- Cardoso, A.P.S., 1990. Café. Cultura e tecnologia primária. Instituto de Investigação Científica Tropical, Lisboa, 44-48.
- Carlson, S.J.; Chourey, P.S.; Helentjaris, T. & Datta, R., 2002. Gene expression studies on developing kernels of maize sucrose synthase (SuSy) mutants show evidence for a third SuSy gene. *Plant Mol. Biol.* 49: 15-29.
- Carvalho, V.D.; Chalfoun, S.M.S. & Chagas, S.J., 1989. Relação entre classificação de café pela bebida e composição físico-química, química e microflora do grão beneficiado. In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 15, Maringá. Resumos, Rio de Janeiro: MIC/IBC. P.25
- Chen, Y.C. & Chourey, P.S., 1989. Spatial and temporal expression of the two sucrose synthase genes in maize: immunohistological evidence. *Theor. Appl. Genet.* 78: 553-559.
- Chourey, P.S. & Nelson, O.E., 1976. The enzymatic deficiency conditioned by the shrunken 1 mutation in maize. *Biochem. Genet.* 14: 1041-1055.
- Chourey, P.S., 1981. Genetic control of sucrose synthetase in maize endosperm. *Mol. Gen. Genet.* 184: 372-376.

- Claussen, W.; Loveys, B.R. & Hawker, J.S., 1985. Comparative investigations on the distribution of sucrose synthase activity and invertase activity within growing, mature and old leaves of some C₃ and C₄ plant species. *Physiol. Plant* 65: 275-280.
- Clifford, M.N., 1985. Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. In: Clifford MN and Wilson KC, eds. *Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage*, London: Croom Helm, 305-375.
- Copeland, L., 1990. Enzymes of Sucrose Metabolism. *Methods in Plant Biochemistry*, Academic Press, San Diego 3: 73-83.
- Damon, S.; Hewitt, J.; Nierder, M. & Bennett, A. B., 1988. Sink metabolism in tomato fruit: II. Phloem unloading and sugar uptake. *Plant Physiol.*, 87: 731-736.
- De Castro, R. & Marraccini, P., 2006. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. *Braz. J. Plant Physiol.* 18: 175-199.
- De Maria, C.A.B.; Trugo, L.C.; Aquino Neto, F.R.; Moreira, R.F.A. & Alvio, C.S., 1996. Composition of green coffee fractions and their contribution to the volatile profile formed during roasting. *Food Chem.* 50: 141-145.
- Dedecca, D.M., 1957. Anatomia e desenvolvimento ontogenético de *Coffea arabica* L. var. Typica Cramer. *Bragantia* 16: 315-355.
- Déjardin, A.; Rochat, C.; Wuillém, S. & Boutin, J.P., 1997a. Contribution of sucrose synthase, ADP - glucose pyrophosphorilase and starch synthase to starch synthesis in developing pea seeds. *Plant Cell. Envir.* 20: 1421-1430.

- Déjardin, A.; Rochat, C.; Maugenest, S. & Boutin, J.P., 1997b. Purification, characterization and physiological role of sucrose synthase in the pea seed coat (*Pisum sativum*). *Planta* 201: 128-137.
- Doehlert, D.C. & Huber, S.C., 1984. Phosphate inhibition of spinach leaf sucrose phosphate synthase as affected by glucose-6-phosphate and phosphoglucisomerase. *Plant Physiol.* 76: 250-253.
- Doehlert, D.C., 1990. Distribution of enzymes activities within the developing maize kernell in relation to starch, oil, and protein accumulation. *Physiol. Plant.* 8: 560-567.
- Duncan, K.A.; Hardin, S.C. & Huber, S.C., 2006. The three maize sucrose synthase isoforms differ in distribution, localization, and phosphorylation. *Plant Cell Physiol.* 47: 959-971.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A. & Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- Ehret, D.L., & Ho, L.C., 1986. The effects of salinity on dry matter partitioning and fruit growth in tomatoes grown in nutrient film culture. *J. Hort. Sci.* 61: 361-367.
- Escherich, W., 1980. Free space invertase, its possible role in phloem unloading. *Ber. Deut. Bot. Ges.* 93: 87-113.
- Farrar, J.; Pollock, C. & Gallagher, J., 2000. Sucrose and integration of metabolism in vascular plants. *Plant Sci.* 154: 1-11.
- Fu, H. & Park, W.D., 1995. Sink and vascular associated sucrose synthase

- functions are encoded by different gene classes in potato. *Plant Cell* 7: 1369-1385.
- Gerrits, P.P.; Smid, L., 1983. A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *J. Microscopy* 132: 81-85.
- Geromel, C.; Ferreira, L.P.; Cavalari, A.A.; Pereira, L.F.P.; Guerreiro, S.M.C.; Vieira, L.G.E.; Leroy, T.; Pot D.; Mazzafera, P. & Marraccini, P., 2006. Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. *J. Exp. Bot.* 57: 3243-3258.
- Goldberg, R.B.; Susan, J.B. & Perez, G.L., 1989. Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell* 56: 149-160.
- Guerreiro Filho, O., 1992. *Coffea racemosa* Lour: une revue. *Café Cacao Thé* XXXVI: 171-186.
- Hawker, J.S., 1985. Sucrose. In *Biochemistry of Storage Carbohydrate in Green Plants*, P.M. Dey and R.A. Dixon, eds. London, Academic Press, pp. 1-51.
- Herbers, K. & Sonnewald, U., 1998. Molecular determinants of sink strength. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 207-216.
- Ho, L.C., 1996. The mechanism of assimilate partitioning and carbohydrate compartmentation in fruit in relation to the quality and yield of tomato. *J. Exp. Bot.* 47: 1239-1243.

- Hubbard, N.L.; Pharr, D.M. & Huber, S.C., 1990. Role of sucrose phosphate synthase in sucrose biosynthesis in ripening bananas and its relationship to the respiratory climacteric. *Plant Physiol.* 94: 201-208.
- Hubbard, N.L.; Pharr, M. & Huber, S.C., 1991. Sucrose phosphate synthase and other sucrose metabolizing enzymes in fruits of various species. *Plant. Physiol.* 82: 191-196.
- Huber, S.C. & Huber, J.L., 1992. Role of sucrose-phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. *Plant Physiol.* 99: 1275-1278.
- Huber, S.C.; McMichael, R.W.; Huber, J.L.; Bachamn, M.; Yamamoto, Y.T. & Conkling, M.A., 1995. Light regulation of sucrose synthesis and possible involvement of cytosolic Ca^{2+} . In *Carbon Partitioning and Source-Sink Interactions in Plants*. *Curr. Topic Plant Physiol.* 13: 35-44.
- ICO International Coffee Organization (2002) Coffee quality – Improvement programme – Implementation, ICC Resolution No. 407, 1 February 2002, 3 pp.
- Johansen, D.A., 1940. *Plant microtechnique*. New York. McGraw-Hill
- Kleines, M.; Elster, R.C.; Rodrigo, M.J.; Blervacq, A.S.; Salamini, F. & Bartels, D., 1999. Isolation and expression analysis of two stress-responsive sucrose-synthase genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* (Hochst.). *Planta*. 209: 13-24.
- Klotz, K.L.; Finger, F.L. & Shelver, W.L., 2003. Characterization of two sucrose synthase isoforms in sugarbeet root. *Plant Physiol. Biochem.* 41: 107-115.
- Koch, K., 2004. Sucrose metabolism: regulatory mechanism and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 235-246.

- Koch, K.E. & Zeng, Y., 2002. Molecular approaches to altered C partitioning: genes for sucrose metabolism. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127: 474-483.
- Komatsu, A.; Moriguchi, T.; Koyama, K.; Omura, M. & Akihama, T., 2002. Analysis of sucrose synthase genes in citrus suggests different roles and phylogenetic relationships. *J. Exp. Bot.* 53: 61-71.
- Ky, C.L.; Louarn, J.; Dussert, S.; Guyot, B.; Hamon, S. & Noirot M., 2001. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chem.* 75: 223-230.
- Lalonde, S.; Boles, E.; Hellmann, H.; Barker, L.; Patrick, J.W.; Frommer, W.B. & Ward, J.M., 1999. The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. *Plant Cell* 11: 707-726.
- Leroy, T., Ribeyre, F., Bertrand, B., Charmetant, P., Dufour, M., Montagnon, C., Marraccini, P. & Pot, D., 2006. Genetics of coffee quality. *Braz. J. Plant Physiol.*, 18: 229-242.
- Levy, F.A., Bogdam, I., Ferraz, J.T., DellaTorre, M.A. & Carvalho, A., 1989. Precocidade de maturação no cafeeiro. 15º Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, Maringá, Pr, Brasil. Instituto Brasileiro do Café (Rio de Janeiro) 155-157.
- Lowell, C.A.; Tomlinson, P.T. & Koch, E., 1989. Sucrose-metabolizing enzymes in transport tissues and adjacent sink structures in developing citrus fruit. *Plant Physiol.* 90: 1394-1402.
- Marraccini, P.; Rogers, W.J.; Caillet, V.; Deshayes, A.; Granato, D.; Lausanne, F.; Lechat, S.; Pridmore, D. & Pétiard, V., 2005. Biochemical and molecular

- characterization of α -D-galactosidase from coffee beans. *Plant Physiol. Biochem.* 43: 909-920.
- Medina Filho, H.P., Carvalho, A., Sondahl, M.R., Fazuoli, L.C. & Costa, W.M. 1984. Coffee breeding and related evolutionary aspects. *Plant Breed. Rev.* 2: 157-193.
- Mendes, A.J.T., 1941. Cytological observations in *Coffea*. VI Embryo and endosperm development in *Coffea arabica* L. *Am. J. Bot.* 28: 784-789.
- O'Brien, T.P.; Feder, N. & McCully, M.E., 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* 59: 368-373.
- Ordóñez, R.M.; Vattuone, M.A. & Isla, I.I., 2005. Changes in carbohydrate content and related enzyme activity during *Cyphomandra betacea* (Cav.). Fruit maturation. *Post. Biol. Tec.* 35: 293-301.
- Patrick, J.W. & Offler, C.E., 1995. Post-sieve element transport of sucrose in developing seeds. *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 681-702.
- Portes, T.A. & Castro Junior, L.G.C., 1991. Análise de crescimento de plantas: um programa computacional auxiliar. *Ver. Bras. Físio. Veg.* 3: 53-56.
- Quick, P. & Schaffer, A.A., 1996. Sucrose metabolism in sinks and sources. In: E. Zamski and A.A. Schaffer, Editors, *Photoassimilate distribution in plants and crops, source-sink relationships*, Marcel Dekker, New York 115-156.
- Ramaiah, P.K., Vasudeva, N., 1969. Observations on the growth of coffee berries in South India. *Turrialba*. 19: 455-464.
- Redgwell, R.J; Curti, D.; Rogers, W.J.; Nicolas, P. & Fischer, M., 2003. Changes to the galactose/mannose ratio in galactomannans during coffee bean (*Coffea*

- arabica* L.) development: implications for in vivo modification of galactomannan synthesis. *Planta* 217: 316-326.
- Robinson, N.L., Hewitt, J.D., Bennett, A.B., 1988. Sink metabolism in tomato fruit: I. Developmental changes in carbohydrate metabolizing enzymes. *Plant Physiol.* 87: 727-730.
- Rogers, W.J.; Bézard, G.; Deshayes, A.; Meyer, I.; Pétiard, V. & Marraccini, P., 1999a. Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm. *Plant Physiol. Biochem.* 37: 261-272.
- Rogers, W.J.; Michaux, S.; Bastin, M. & Bucheli, P., 1999b. Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C. arabica*). *Plant Sci.* 149: 115-123.
- Roitsch, T.; Baiibrea, M.; Hofmann, R.; Proesis, A. & Sinha, A.K., 2003. Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *J. Exp. Bot.* 54: 513-524.
- Roitsch, T. & González, M.C., 2004. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends Plant Sci.* 9: 606-613.
- Ross, H.A. & Davies, H.V., 1992. Sucrose metabolism in tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). Effects of sink removal and sucrose flux on sucrose-degrading enzymes. *Plant Physiol.* 98: 287-293.
- Ruan, Y.L. & Patrick, J.W., 1995. The cellular pathway of post-phloem sugar transport in developing tomato fruit. *Planta* 196: 434-444.

- Salazar-Gutiérrez, M.R.; Chaves-Córdoba, B.; Riano-Herrera, N.M.; Arcila-Pulgarin, J. & Jaramillo-Robledo 1994. Crecimiento del fruto de café *Coffea arabica* L. var. Colombia. Cenicafe. 45: 41-50.
- Salnikov, V.V.; Grimson, M.J.; Seagull, R.W. & Haigler, C.H., 2003. Localization of sucrose synthase and callose in freeze-substituted secondary-wall-stage cotton fibers. Protoplasma 221:175-184.
- Siegl, G. & Still, M., 1990. Partial purification of two forms of spinach leaf sucrose-phosphate synthase which differ in their kinetic properties. Plant Sci. 66: 205-210.
- Simpson, B.B. & Conner-Orgozaly, M., 1995. Economic botany: Plants in our world. Ed. McGraw-Hill, New York, 446-457.
- Somogyi, N., 1952. Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195: 19-23.
- Sturm, A., 1999. Invertases: primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. Plant Physiol. 121: 1-7.
- Sun, J.D.; Loboda, T.; Sung S-J.S. & Black, C.C., 1992. Synthase in wild tomato, *Lycopersicon chemielewskii*, and tomato fruit sink strength. Plant Physiol. 98: 1163-1169.
- Sung, S.S.; Xu, D.P. & Black, C.C., 1989b. Identification of actively filling sucrose sinks. Plant Physiol. 89: 1117-1121.
- Tanase, K. & Yamaki, S., 2000. Purification and characterization of two sucrose synthase isoforms from Japanese pear fruit. Plant Cell Physiol. 41: 408-414.

- Vaast, P.; Angrand, J.; Franck, N.; Dauzat, J. & Génard, M., 2005. Fruit load and branch ring-barking affect carbon allocation and photosynthesis of leaf and fruit of *Coffea arabica* in the field. *Tree Physiol.* 25: 753-760
- Vaast, P.; Bertrand, B.; Perriot, J.J.; Guyot, B. & Génard, M., 2006. Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea arabica* L.) under optimal conditions. *J. Sci. Food Agr.* 86: 197-204.
- Van Handel, E., 1968. Direct microdetermination of sucrose. *Anal. Biochem.* 22: 280-283.
- Viani, R., 1986. Coffee, in: *Encyclopedia of Industrial Chemistry*, A7, VCH Verlag, Weinheim, 315-339.
- Vieira, L.G.E., Andrade, A.C., Colombo, C.A., Moraes, A.A.H., Metha, A., Oliveira, A.C., Labate, C.A., Marino, C.L., Monteiro-Vitorello, C.B., Monte, D.C., Giglioti, E., Kimura, E.T., Romano, E., Kuramae, E.E., Lemos, E.G.M., Almeida, E.R.P., Jorge, E.C., Barros, E.V.S.A., Silva, F.R., Vinecky, F., Sawazaki, H.E., Dorry, H.F.A., Carrer, H., Abreu, I.N, Batista, J.A.N., Teixeira, J.B., Kitajima, J.P., Xavier, K.G., Lima, L.M., Camargo, L.E.A., Pereira, L.F.P., Coutinho, L.L., Lemos, M.V.F., Romano, M.R., Machado, M.A., Costa, M.M.C., Grossi de Sá, M.F., Goldman, M.H.S., Ferro, M.I.T., Tinoco, M.L.P., Oliveira, M.C., Sluys, M.A.V., Shimizu, M.S., Maluf, M.P., Eira, M.T.S., Guerreiro Filho, O., Arruda, P., Mazzafera, P., Mariani, P.D.S.C., Oliveira, R.L., Harakava, R., Balbao, S.F., Tsai, S.M., Mauro, S.M.Z., Santos, S.N., Siqueira, W.J., Costa, G.G.L., Formighieri, E.F.,

- Carazzolle, M.F. & Pereira, G.A.G., 2006. Brazilian coffee genome project: an EST-based genomic resource. *Braz J Plant Physiol* 18, 95-108.
- Vincent, J.C. 1985. Green coffee processing. *In* R Macrae, ed, *Coffee*. Vol 2. Technology, Vol. 2. Elsevier Applied Science, London, pp 1-33
- Walker, J.L. & Huber, S.C., 1989. Regulation of sucrose phosphate synthase activity in spinach leaves by protein level and covalent modification. *Planta* 177: 116-120.
- Walker, R.P. & Pollock, C.J., 1993. The purification and characterization of soluble acid invertase from coleoptiles of wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Avalon). *J. Exp. Bot.* 44: 1029-1037.
- Weber, H.; Heim, U.; Golombek, S.; Borisjuk, L. & Wobus, U., 1998. Assimilate uptake and the regulation of seed development. *Seed Sci. Res.* 8: 331-345.
- Wendler, R.; Veith, R.; Dancer, J.; Stitt, M. & Komor, L., 1990. Sucrose storage in cell suspension cultures of *Saccharum* sp. (sugarcane) is regulated by a cycle of synthesis and degradation. *Planta* 183: 31-39.
- Winter, H. & Huber, S.C., 2000. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Crit. Rev. Plant Sci.* 19: 31-67.
- Wolfrom, M.L.; Plunkett, R.A. & Laver, M.L., 1960. Carbohydrates of coffee bean. *J. Agric. Food Chem.* 8: 58-65.
- Wormer, T.M., 1964. The growth of coffee berry. *Ann. Bot.* 28: 47-65.
- Yelle, S.R.T.; Chetelat, R.T.; Dorais, M.; DeVerna, J.W. & Bennett, A.B., 1991. Sink metabolism in tomato fruit: IV. Genetic and biochemical analysis of sucrose accumulation. *Plant Physiol.* 95: 1026-1035.



RESEARCH PAPER

Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development

Clara Geromel^{1,*}, Lu'cia Pires Ferreira^{2,*}, Sandra Maria Carmelo Guerreiro⁴, Aline Andre'ia Cavalari¹, David Pot^{2,5}, Luiz Filipe Prota'sio Pereira^{2,3}, Thierry Leroy⁵, Luiz Gonzaga Esteves Vieira², Paulo Mazzafera¹ and Pierre Marraccini^{2,5,7}

1

UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas), Departamento de Fisiologia Vegetal, IB, CP 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

2

IAPAR (Instituto Agrono'mico do Parana'), LBI-AMG, CP 481, 86001-970 Londrina PR, Brazil

3

EMBRAPA Cafe', Laborato'rio de Biotecnologia, CP 481, 86047-902 Londrina, PR, Brazil

4

UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas), Departamento de Bota'nica, IB, CP 6109, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

5

Cirad, UMR PIA, Avenue d'Agropolis, F-34398 Montpellier Cedex 5, France

Received 3 February 2006; Accepted 20 June 2006

Abstract

Sucrose metabolism and the role of sucrose synthase were investigated in the fruit tissues (pericarp, perisperm, and endosperm) of *Coffea arabica* during development. Acid invertase, sucrose phosphate synthase, and sucrose synthase activities were monitored and compared with the levels of sucrose and reducing sugars. Among these enzymes, sucrose synthase showed the highest activities during the last stage of endosperm and pericarp development and this activity paralleled closely the accumulation of sucrose in these tissues at this stage. Carbon partitioning in fruits was studied by pulse–chase experiments with

C-sugars and revealed high rates of sucrose turnover in perisperm and endosperm tissues. Additional feeding experiments with ¹⁴CO₂ showed that leaf photosynthesis contributed more to seed development than the pericarp in terms of photosynthate supply to the endosperm. Sugar analysis, feeding experiments, and histological studies indicated that the perisperm plays an important role in this downloading process. It was observed that the perisperm presents a transient accumulation of starch

which is degraded as the seed develops. Two full-length cDNAs (CaSUS1 and CaSUS2) and the complete gene sequence of the latter were also isolated. They encode sucrose synthase isoforms that are phylogenetically distinct, indicating their involvement in different physiological functions during cherry development. Contrasting expression patterns were observed for CaSUS1 and CaSUS2 in perisperm, endosperm, and pericarp tissues: CaSUS1 mRNAs accumulated mainly during the early development of perisperm and endosperm, as well as during pericarp growing phases, whereas those of CaSUS2 paralleled sucrose synthase activity in the last weeks of pericarp and endosperm development. Taken together, these results indicate that sucrose synthase plays an important role in sugar metabolism during sucrose accumulation in the coffee fruit.

Key words: *Coffea arabica*, endosperm, gene expression, sucrose synthase, sugar partitioning.

Introduction

Coffee is a very important crop with more than seven millions tons of green beans produced every year on about 11 millions hectares worldwide. After oil, coffee ranks second on international trade exchanges, being responsible for several million jobs in producer and consumer

* These authors contributed equally to this work.

^y To whom correspondence should be addressed at Cirad/EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia, PBI, CP 02372, 70770-900 Brasília, DF, Brazil. E-mail: marraccini@cirad.fr

^a The Author [2006]. Published by Oxford University Press [on behalf of the Society for Experimental Biology].

All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oxfordjournals.org

countries. The two main species cultivated throughout the tropical world are *Coffea arabica* ($2n=4x=44$), which grows in highlands and represents approximately 70% of world production, and *Coffea canephora* ($2n=2x=22$), which grows in lowlands and represents the remaining 30%. Production involving other species, such as *Coffea liberica*, is incipient and consumption limited to local and restricted markets (Sønderdal and Lauritis, 1992).

In terms of cup quality, *C. arabica* (Arabica) is appreciated to a greater extent by consumers due to its lesser bitterness and better flavour compared with *C. canephora* (Robusta). What exactly determines cup quality is a complex phenomenon that is far from being understood. Sucrose is one of the compounds in the raw coffee bean that has been implicated as an important precursor of coffee flavour and aroma because it degrades rapidly during roasting, forming anhydro-sugars (such as 1,6 anhydro-glucose) and other compounds like glyoxal (De Maria et al., 1994). Such molecules are then able to react principally with amino acids (Maillard reaction) forming aliphatic acids, hydroxymethyl furfural and other furans, and pyrazine. These compounds are all considered to be essential contributors to coffee flavour, either as volatile (Grosch, 2001) or non-volatile (Homma, 2001) components. The preference for Arabica coffees seems to be related in part to differences in sucrose content (Casal et al., 2000), which range from 5.1% to 9.4% of dry matter in harvested coffee beans of this species, whereas for Robusta these values are always lower, usually ranging from 4% to 7% of dry matter (Ky et al., 2001; Campa et al., 2004).

Despite the importance of sucrose as a precursor of coffee beverage quality, nothing is known about its distribution in tissues nor the role of key enzymes of its metabolism, such as invertases (EC 3.2.1.26, b-fructosidase, b-fructofuranosidase), sucrose phosphate synthase (SPS: EC 2.4.1.14), and sucrose synthase (SUS: EC 2.4.1.13). Invertases, which catalyse the irreversible hydrolysis of sucrose to glucose and fructose, are involved in various aspects of the plant life cycle and the response of the plant to environmental stimuli (Roitsch and González, 2004). By contrast, SPS (UDP-glucose: D-fructose 6-phosphate 2-glucosyl-transferase) appears to function mainly in the direction of sucrose synthesis (UDP-glucose + fructose-P → sucrose-P + UDP) while SUS (UDP-glucose: D-fructose 2-glucosyl-transferase) catalyses a reversible reaction (UDP-glucose + fructose ↔ sucrose + UDP). Both enzymes are thought to play a major role in sucrose partitioning for energy purposes as well as in metabolic, structural, and storage

functions of plant cells (see review by Sturm and Tang, 1999). Sucrose cleavage activity of SUS is also linked to cell wall biosynthesis by providing UDP-glucose for the cellulose synthase complex (Amor et al., 1995) and substrates for starch synthesis in sink organs (see review by Herbers and Sonnewald, 1998).

The present study was conducted to understand sucrose metabolism and its transport during coffee fruit development. Concentrations of reducing sugars and sucrose, and activities of sucrose-metabolizing enzymes, were monitored in the pericarp, perisperm, and endosperm throughout fruit development. To analyse sugar partitioning between these tissues, histological studies and feeding experiments using ^{14}C -labelled sucrose, fructose, and CO_2 were carried out. In addition, two distinct SUS-encoding cDNAs were isolated (designated CaSUS1 and CaSUS2) from mRNA of coffee endosperm. The molecular structure of these sequences and relationships between sucrose/reducing sugar contents, activities of sucrose-metabolizing enzymes, and expression of SUS genes are presented and discussed.

Materials and methods

Plant materials

Fruits and tissues were harvested from 15-year-old plants of *Coffea arabica* cv. IAPAR 59 cultivated under field conditions. Fruits were collected between 13.00 h and 16.00 h, every 4 weeks from flowering (end of September 2002) up to complete maturation (mid-May 2003). After collection, tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C before being analysed. Fruit tissues (perisperm, endosperm, and pericarp) were separated and used independently to extract total RNA or were analysed for sugars and enzyme activity.

¹⁴

The same material was used for the $^{14}\text{CO}_2$ and C feeding experiments.

Sugar determination, enzymatic analysis and western blotting

Fruit tissues were freeze-dried, ground in a mortar and pestle, and extracted with 80% ethanol in a Polytron homogenizer using 1 ml per 300 mg of tissue. Extraction proceeded for 30 min at 75°C in cap-sealed tubes and the supernatant was obtained after centrifugation. The extraction was carried out three times with the same volume of ethanol, and the combined supernatants were used for the analysis of sugars. Total soluble sugars (Dubois et al., 1956), sucrose (Van Handel, 1968), and reducing sugars (Somogyi, 1952) were determined in the extracts. For analysis of enzymes the tissues were extracted with 100 mM HEPES, pH 7.0, containing 2 mM MgCl_2 , 10 mM 2-mercaptoethanol, and 2% (w/v) ascorbic acid. The supernatant recovered by centrifugation (27 000 g for 20 min) was desalted on PD10 minicolumns (Amersham Biosciences) and the protein content determined with a ready-to-use Bradford (1976) reagent (Bio-Rad). Acid invertase (AI) was assayed by incubating an aliquot of the desalted extract containing 60 μg of protein with 25 mM sucrose in 50 mM citrate-phosphate buffer pH 3.5, at 37°C , for 1 h (modified from Yelle et al., 1991). SPS was assayed by incubating 60 μg of protein with 25 mM uridine 5-diphosphoglucose (UDPG), 25 mM fructose-6-phosphate, 30 mM glucose-6-phosphate, 20 mM phenyl-b-glucoside in 50 mM K-phosphate buffer, pH 7.5. The assay was incubated at 37°C for 1 h and stopped by the addition of 30% (w/v) KOH and boiling for 10 min. Sucrose phosphate content was determined according to Van Handel (1968). SUS activity was assayed in the direction of sucrose synthesis in a reaction containing 50–60 μg of protein, 25 mM UDPG, 25 mM D-fructose, 50 mM 2-(N-morpholino)ethanesulphonic acid hydrate (MES), at pH 6. The amount of protein, substrate concentrations, and pH used in this assay were defined in preliminary tests. After 60 min of incubation at 30°C the reaction was stopped by the addition of 30% (w/v) KOH and boiling for 10 min. Sucrose content was determined according to Van Handel (1968). Extracts obtained for enzyme analysis were used in western blot experiments. The proteins were separated by 10% (w/v) polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes using a Mini protean electrophoresis apparatus (Bio-Rad). The membranes were probed with a polyclonal antibody towards SUS from *Pisum sativum* using the protocol described by De'jardin et al. (1997). The membranes were developed using an anti-rabbit secondary antibody conjugated with alkaline phosphatase.

¹⁴

C-feeding experiments

Three pulse-chase experiments were carried out to study sucrose metabolism in coffee fruits. In the first experiment, incubation with

¹⁴

CO_2 was carried out with fruits at 120 620 DAF with the perisperm, endosperm, and pericarp representing respectively 20%, 28%, and 52% of the fruit fresh weight, or with leaves. Two Eppendorf tubes were left inside the plastic bags, one

containing a 1 M HCl solution and the other an aqueous solution carrying 10 Mdpm NaH¹⁴CO₃ (50–62 mCi mmol⁻¹, Amersham Biosciences). By external handling, the tubes were opened and the contents mixed. The branches were left enclosed in the plastic bags from 06.00 h to 10.00 h, the bags opened and the fruits collected the next day (08.00 h). The fruits were separated into endosperm, perisperm, and pericarp, freeze-dried, and extracted as described for the sugar measurements. The radioactivity in each extract was then estimated in a scintillation counter after the addition of scintillation fluid. To eliminate interference by chlorophyll quenching, a known amount of radioactivity was added to each sample and the radioactivity counted again. These data were used to calculate the counting efficiency and thereby to correct the values obtained in the first counting. In other experiments, fruits were harvested, fixed with lanolin in plastic boxes and fed either with

0.9 ICi [U-¹⁴C]sucrose (50 ICi mmol⁻¹) or [U-¹⁴C]fructose (50 ICi mmol⁻¹) (Amersham Biosciences) and then kept under a 100 W incandescent light positioned 50 cm (approximately 80 lmol photons m⁻² s⁻¹) over the boxes for 24 h. Endosperm, perisperm, and pericarp tissue were separated and processed as above for radioactivity determination. In this experiment, the ethanolic extracts were

reduced in volume in a SpeedVac(Savant) and the sugars separated by descending paper chromatography using ethyl acetate:pyridine:H₂O:acetic acid:propionic acid (50:50:10:5:5, by vol.) as solvent. Glucose, fructose, and sucrose were applied over the samples and also in lateral lanes (50 lg) as markers. The chromatograms were developed for 20 h and the sugars revealed with aniline reagent (Walkey and Tillman, 1977). The spots were cut from the chromatograms in thin strips that were then placed in scintillation flasks. After addition of 1 ml methanol and 5 ml scintillation fluid, the radioactivity was determined in a scintillation counter (LS 6500 Scintillation Counter, Beckman) for 10 min. Spots of glucose and fructose were placed together in the same flasks. The lateral control markers were also processed in the same way. As mentioned above, a known amount of radioactivity was added to each sample and the radioactivity counted again in order to correct for quenching interference. In a third experiment, fruits at different maturation stages were collected from the same tree and placed inside a glass flask sealed with a rubber cap containing a tube with an aqueous solution with 4 Mdpm NaH¹⁴CO₃ (50–62 mCi mmol⁻¹, Amersham Biosciences) to which a few drops of 3 M HCl solution were applied with a syringe. The experiment was carried out under light as described for sugar feeding. The flask was then opened and the fruits left for a further 24 h. Since fruits at different developmental stages were used in this experiment, following incubation each fruit was weighed separately and separated into four groups: pinheads (60 DAF), green 1 (130 DAF), green 2 (165 DAF), and mature (234 DAF). For each group, endosperm, perisperm, and endocarp were separated and

processed as above for radioactivity determination.

Histological studies

Fruits were collected at 40, 60–75, and 205–234 DAF and fixed in neutral formalin buffer (10% (v/v) formol, 0.4% (w/v) NaH₂PO₄, H₂O, 0.65% (w/v) anhydrous Na₂HPO₄). Dehydration was carried out by treating segments sequentially with 30%, 50%, and 70% (v/v) ethanol for 12 h at each concentration. The material was then treated with a plastic resin (Historesin, Leica) according to the protocol of Gerrits and Smid (1983). The polymerized resin blocks were then glued onto wooden blocks with plastic adhesive and 12 lm-thick sections cut on a rotary microtome (American Optical M 820, Phoenix). The sections were mounted on glass slides, heated to 65 °C, followed by staining for 3 min in 0.05% (v/v) toluidine blue in 0.1 M acetate buffer, pH 4.7, and washing in running water for 5 min (O'Brien et al., 1964). Sections were tested for starch with Lugol's iodine solutions according to Johansen (1940). The sections were observed and photographed with a light microscope (Olympus, model BX51).

cDNA isolation and gene cloning

Cloning of SUScDNA sequences was facilitated by the use of EST available from the Brazilian Coffee Genome Project (<http://www.lge.ibi.unicamp.br/cafe/>). The CaSUS1cDNA was isolated from endosperm of fruits at 147 DAF. Total RNA was extracted as described previously (Rogers et al., 1999a) and 500 lg were treated with Oligotex dT beads (Qiagen) to purify 2 lg of mRNA which was reverse-transcribed according to the protocol defined in the Marathon cDNA amplification kit (BD Biosciences Clontech). Subsequently, a 39 RACE PCR reaction was performed using the AP1 primer 59-CCA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC-39 from the Kit and the UPC1C3M1 SUS primer 59-TAT ACT CTG TTT CTC CGT TAC TCT TTT TT-39 deduced from a cluster formed by the compilation of 250 SUS-encoding ESTs, found within the Brazilian Coffee Genome Project. PCR was performed using a PTC-100 Thermocycler (MJ Research) with Advantage2 TaqDNA polymerase according to the supplier (BD Biosciences Clontech) under the following conditions: initial denaturation 94 °C, 1 min; followed by 35 cycles of 94 °C, 30 s; 52 °C, 30 s; and 72 °C, 6 min, and a final extension step of 72 °C, 6 min. A PCR fragment of about 3 kb was obtained, ligated in pTOPO2.1 (Invitrogen) and amplified in E.coliTOP10 cells (Invitrogen). A recombinant plasmid was selected, purified using the Qiafilter extraction Kit (Qiagen) and double-strand sequenced with universal and internal primers. The CaSUS2cDNA was isolated by the same 39 RACE PCR reaction as described for CaSUS1cDNA isolation, except that mRNAs were from endosperm of fruits at 234 DAF. The UPC4M1 59-GAA AGC GCT AGA GAA CTC TTG ATC GAG TA-39 primer used was deduced from a SUS-encoding contig formed by the compilation of 12 ESTs that did not cluster with the CaSUS1cDNA. PCR was performed as follows: initial denaturation 94 °C, 1 min, and 35 cycles of 94 °C, 30 s; 68 °C, 6 min, with a final extension step of 72 °C, 6 min. The PCR amplified fragment was treated as previously described. The CaSUS2gene was amplified from genomic DNA (10 ng) of C.arabica cv. IAPAR 59 using the primers UPC4M1 and

REVC7 59-GGA AGA CTG CCG CGG AGA CCA GAC ATC T-39 deduced from its corresponding cDNA. PCR conditions used for the CaSUS2cDNA amplification were as described for CaSUS1, except that 40 cycles were performed. The fragment obtained was cloned in pTOPO2.1 (Invitrogen) and double-strand sequenced.

Probe preparation

The internal probe (probe A: 667 bp) of CaSUS1 was amplified by PCR using this cDNA as a template, the specific primers SUS10 59-GTT ATC CTG ATA CCG GTG-39 and SUS11 59-GGA TCA AAA ACA TCA ATG CC-39, and the Advantage2 TaqDNA polymerase under the following conditions: initial denaturation step 94 °C, 1 min; followed by 35 cycles of 94 °C, 1 min; 50 °C, 1 min; 72 °C, 3 min, with a final extension of 72 °C, 6 min. The 39 probe (probe B: 544 bp) of CaSUS1 was amplified under the same conditions except that the primers UPC5C3 59-AGC GAG CTC CTT GCC AA-39 and REVC5C3 59-CTT ATT ACA AAA TGA CAT TTG A-39 were used. The CaSUS2 probe (probe C: 589 bp) localized in the 39 region of the CaSUS2cDNA was amplified with the primers UPC6 59-ACT CTG CGG CAA TGG TAA A-39 and REVC7 as described above, using this cDNA as template. All these probes were purified by ethanol precipitation in presence of 10% (v/v) NaAc pH 5.2, resuspended in water and quantified. Then 50 ng was labelled by random-priming with 50 ICi of [α -³²P]dCTP (Amersham Biosciences) according to Sambrook et al. (1989).

Northern and Southern-blot analysis

Total RNA (15 lg) was denatured in 12.55 M formamide, 2.2 M formaldehyde, and 20 mM 3-(N-morpholino)-propanesulphonic acid (MOPS) buffer, pH 7.0 (also containing 5 mM Na-acetate and 0.1 mM EDTA) at 65 °C for 5 min and fractionated on a 1.2% (w/v) agarose gel containing 2.2 M formaldehyde in MOPS buffer (Rogers et al., 1999a). Hybridization with Ultrahyb buffer (Ambion) and washing steps were performed according to the manufacturer's recommendations. To ensure that equal amounts of total RNA were loaded, gels stained with ethidium bromide were performed for each northern blot analysis. RNA blots were prepared in duplicate and probed independently with probe A (CaSUS1) and C (CaSUS2). Genomic DNA was extracted from fresh coffee leaves as described previously (Marraccini et al., 2001). For Southern-blot analysis, 10 lg were digested with restriction endonucleases DraI, EcoRI and HindIII independently, separated on a 0.8% (w/v) agarose gel and finally transferred to Hybond N⁺ membranes (Amersham Biosciences). Hybridization and washings were carried out as described before (Marraccini et al., 2001).

Multiple alignments and phylogenetic analysis

Phylogenetic analyses were conducted using MEGA version 3.0 (Kumar et al., 2004). Multiple alignments of SUS proteins were obtained by CLUSTALW program (Thompson et al., 1994) followed by manual adjustment. A phylogenetic tree was inferred by the Neighbor-Joining (NJ) method with Poisson distance. Bootstrap analysis was carried out (5000 trials) to assess support for individual nodes.

Results

Coffee fruit growth

Under the field conditions used in this study, fruits of *C. arabica* cv. IAPAR 59 completed their maturation within eight to nine months. Since fruits did not grow during the first two months following anthesis and fecundation (Fig. 2A), producing cherries of very small size (<2 mm), tissue separation was not possible at this stage, which explains the absence of data for sugars (Fig. 2C, D) and enzymatic assays (Fig. 3A, C) at 30 d after flowering (DAF). Between 60 and 90 DAF, a rapid expansion of the perisperm occurred, followed by the development of the endosperm which became detectable at 75 DAF and easily separable from the perisperm at 118 DAF, when perisperm and endosperm were present in equal proportions (Fig. 2B). Afterwards, the perisperm gradually disappeared up to the formation of a thin tissue known as the silver skin membrane, which surrounds the endosperm at the mature stage (Fig. 1C), making its analysis difficult between 205 and 234 DAF. On the other hand, the endosperm turned from a liquid (147 DAF) to the solid state (176 DAF), before dehydration during the month up to harvest (between 205 and 234 DAF). Over the same period, the observed increase of the cherry fresh weight appeared to be related exclusively to the increase in mass of the pericarp (Fig. 2B).

Accumulation of sugars in coffee fruits

Sugar content was measured in each tissue during fruit development. Reducing sugars (glucose and fructose) accumulated during the perisperm expansion phase up to 260 mg g⁻¹ dry weight (DW) at 89 DAF (Fig. 2C). An accumulation of sucrose was also observed over this period, albeit to lesser extent

(32 mg g⁻¹ DW) in this tissue (Fig. 2D). After 89 DAF, both reducing sugars and sucrose

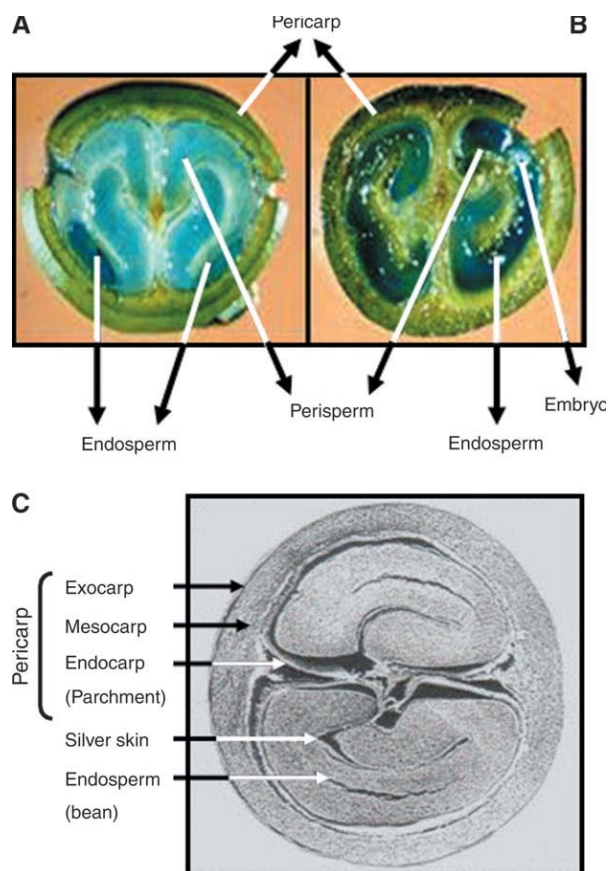


Fig. 1. Cherries of *C. arabica* at 60–90 DAF (A) and 120–150 DAF (B) were sectioned transversely and stained with Evans Blue dye to show the endosperm surrounded by the perisperm (A). After growth (B), the endosperm replaces the space previously occupied by the perisperm. (C) Mature cherry (220–250 DAF) with the endosperm representing the main tissue and the perisperm reduced to the silver skin (courtesy of Nestlé Inc.). The embryo at the distal position can not be observed at this stage.

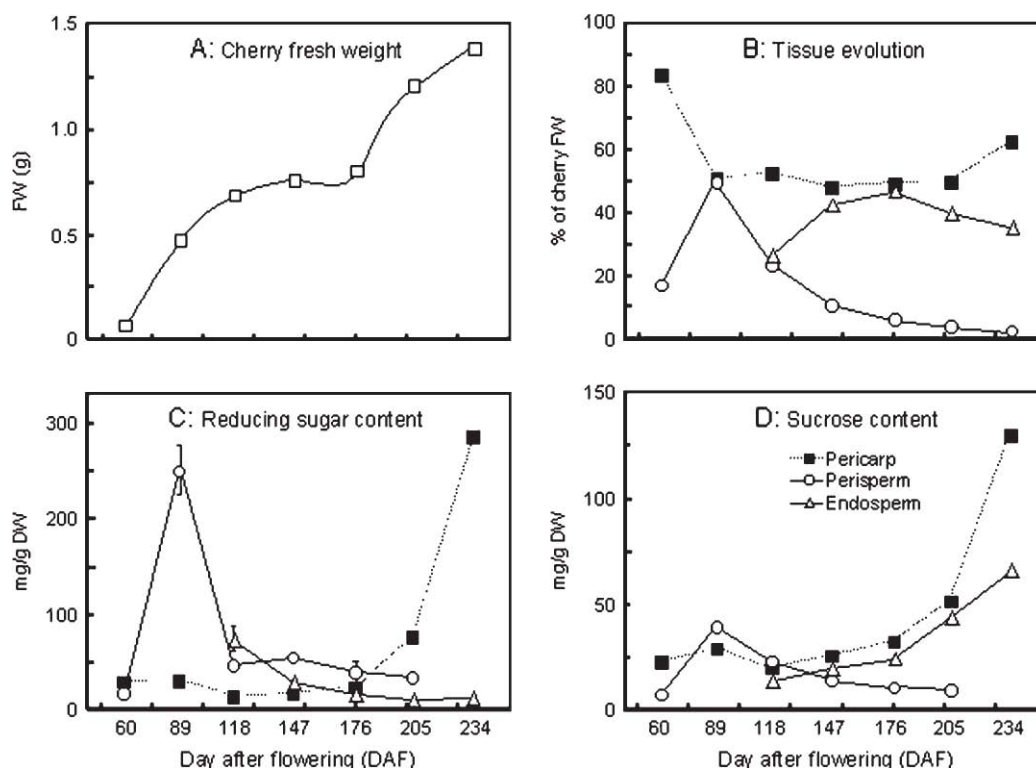


Fig. 2. Weight of tissues, sucrose and reducing sugar contents during *C. arabica* fruit ripening. (A) Cherry fresh weight (FW). (B) Evolution of pericarp (filled squares), perisperm (open circles), and endosperm (open triangles) tissues expressed in percentage of cherry FW. Contents of reducing sugars (C) and sucrose (D) in isolated tissues were expressed as mg g⁻¹ dry weight (DW).

decreased steadily in the perisperm as this tissue disappeared, but the reducing sugars/sucrose ratio always remained greater than 1. In the endosperm, the reducing sugars/sucrose ratio was greater than 1 during the two first developmental stages analysed (118 and 147 DAF). Then, during the following stages, the amount of reducing sugars gradually decreased to become almost undetectable in the mature endosperm (Fig. 2C), whereas sucrose accumulated close to 6% of the DW (Fig. 2D). In the pericarp, the reducing sugars and sucrose presented a sudden accumulation after 176 DAF, reaching, respectively, 280 and 180 mg g⁻¹ of the DW at maturation (Fig. 2C, D).

Enzymatic activities during coffee fruit development

In order to evaluate the importance of sucrose-metabolizing enzymes during coffee fruit development, AI, SPS, and SUS activities were measured in vitro in protein extracts prepared from isolated pericarp (60–234 DAF), endosperm (118–234 DAF), and perisperm (60–205 DAF) tissues (Fig. 3A–C).

AI activity in the perisperm reached a maximum (5.52 lg reducing sugars h⁻¹ lg⁻¹ protein) at 60 DAF (Fig. 3A), therefore preceding the peak of reducing sugars detected at 89 DAF in this tissue (Fig. 2C). Thereafter, AI activity decreased with development becoming undetectable between 89 and 176 DAF. In the pericarp, AI showed two peaks of similar values (near 4 lg reducing sugars h⁻¹ lg⁻¹ protein) at 118 and 205 DAF without concomitant changes of reducing sugar content. Whatever the developmental stage analysed, no AI activity was detected in the endosperm. SPS activity remained low in the perisperm between 60 and 118 DAF, but was maximal (5.16 lg sucrose h⁻¹ lg⁻¹ protein) at 147 DAF and decreased slightly afterwards. In the pericarp, SPS activity was almost negligible during early development, but reached a maximum (6.98 lg sucrose h⁻¹ lg⁻¹ protein) at 205 DAF and decreased up to maturation. As for the perisperm, maximal SPS activity in the endosperm was observed at 147 DAF, and then decreased gradually towards maturation.

SUS activity was low in the perisperm from 60 to 118 DAF, but increased between 147 and 205 DAF.

Activities showed similar patterns in both the pericarp and endosperm, with a small but continuous increase between 60 (pericarp) or 120 (endosperm) and 205 DAF, followed by a sudden increase at harvest time. In addition, activities at 234 DAF presented a similar range (near 23 $\mu\text{g sucrose h}^{-1} \mu\text{g protein}^{-1}$) and paralleled the sucrose accumulation observed in these tissues (Fig. 2D), as well as being relatively constant over the day (data not shown).

A western blot analysis of endosperm proteins was also carried out using antibodies against the major SUS isoform of pea teguments, probably corresponding to the product of the PsSUS1(GB accession number AJ012080) gene (C Rochat, personal communication). Under semi-denaturing

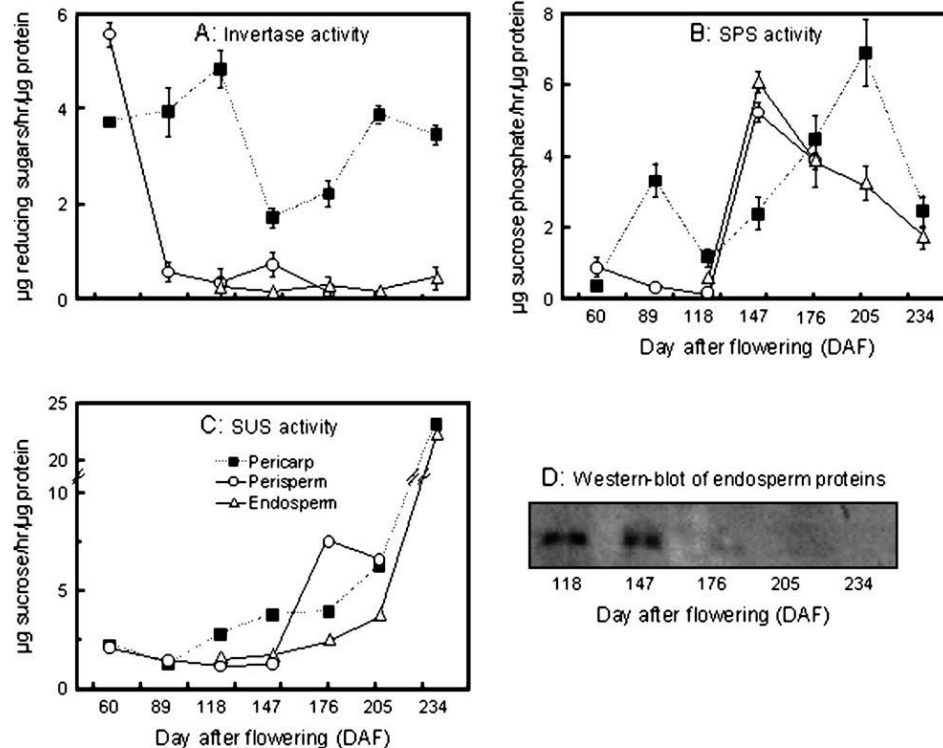


Fig. 3. Enzymatic activities in individual tissues of *C. arabica* fruits under development. The symbols used to represent each tissue are as follows: pericarp (filled squares), perisperm (open circles), endosperm (open triangles). (A) Acid invertase activity was expressed as $\mu\text{g reducing sugars h}^{-1} \mu\text{g protein}^{-1}$. (B) Sucrose-phosphate synthase and sucrose synthase (C) activities were measured as $\mu\text{g sucrose h}^{-1} \mu\text{g protein}^{-1}$. (D) Western blot: proteins were extracted from developing endosperm and probed with polyclonal antibodies raised against the abundant SUS isoform from *Pisum sativum* (De'jardin et al., 1997).

electrophoresis conditions, a single SUS isoform was recognized in protein extracts obtained at 118 and 147 DAF (Fig. 3D). A weaker signal was also observed at 176 DAF, but no antibody cross reaction was detected near maturation, at 205 and 234 DAF.

Analysis of ^{14}C distribution in coffee fruits

To analyse sugar metabolism and transfer in coffee cherries, pulse-chase experiments were performed by incubating leaves or green (6120 DAF) fruits with $^{14}\text{CO}_2$ and measuring the distribution of radioactivity in the different fruit tissues after 24 h (Fig. 4A). When $^{14}\text{CO}_2$ incubations were carried out with fruits, most of the radioactivity remained in the pericarp, but a significant proportion was detected in the perisperm and endosperm. When $^{14}\text{CO}_2$ was supplied to leaves, low radioactivity was found in the pericarp, whereas the perisperm accumulated the major proportion of radioactivity. In both experiments, the large accumulation of radioactivity detected in the perisperm reveals the importance of this tissue in photosynthate translocation within coffee cherries. The distribution of radioactivity was also determined in fruits after 4 h of the incubation with $^{14}\text{CO}_2$ and a similar situation was observed, although less

radioactivity was detected in the fruit tissues (data not shown).

Feeding with ^{14}C -sucrose and ^{14}C -fructose was carried out by applying the labelled compounds to a cut made at the peduncle insertion in the fruit (Fig. 4B–D). In the pericarp, high levels of radioactivity (total and specific) were found in the form of sucrose when labelled sucrose was fed, and as reducing sugar (mainly fructose) when feeding was performed with labelled fructose. Although this experiment did not allow a clear conclusion to be drawn as to the participation of the pericarp in the assimilation process, it did provide information on sugar metabolism in each tissue. For example, the significant accumulation of radioactivity in the perisperm indicates a role for this tissue in the transfer of sugars between the pericarp and the endosperm (Fig. 4B). Besides the transport of labelled sucrose and fructose from the pericarp to perisperm and endosperm, these sugars were readily metabolized to reducing sugars and sucrose, respectively (Fig. 4C, D), indicating the simultaneous synthesis and degradation of sucrose within these tissues. When ^{14}C -sucrose was supplied, the perisperm presented a higher specific radioactivity in the form of sucrose and reducing sugars than for the same sugars found in the endosperm (Fig. 4C). The opposite was observed when

^{14}C -fructose was fed, with the highest sucrose specific radioactivity being found in the endosperm, indicating that active conversion of reducing sugars to sucrose occurred in

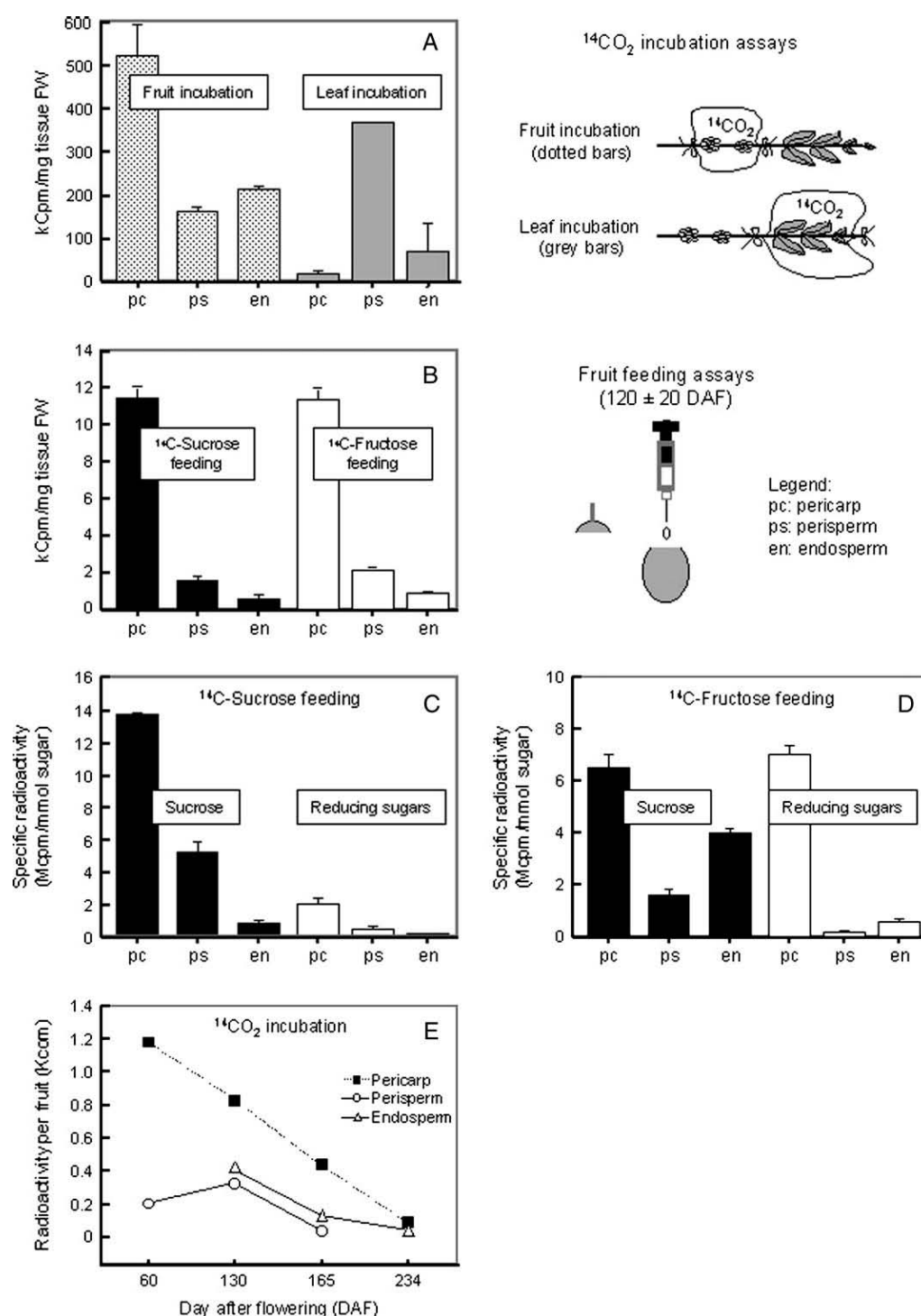


Fig. 4. Analysis of sucrose transport and metabolism in coffee cherries by ^{14}C pulse-chase experiments. (A) Fruits at 120620 DAF (dotted bars) or leaves (grey bars) were exposed to $^{14}\text{CO}_2$ for 24 h and total radioactivity was measured in pericarp (pc), perisperm (ps), and endosperm (en) tissues. A schematic representation of this experiment is also given (right panel of graph A). For feeding experiments (B–D), labelled compounds were applied to a cut made at the peduncle insertion of fruits at 120620 DAF as shown in the schematic representation given in the right panel of graph B. Fruits were then kept illuminated for 24 h and dissected to measure the radioactivity in each tissue. (B) ^{14}C -sucrose (black bars) or ^{14}C -fructose (white bars) were administered and their distribution was estimated by measuring the total radioactivity. After ^{14}C -sucrose (C) or ^{14}C -fructose (D) feedings, the distribution of the radioactivity in sucrose (black bars) and reducing sugars (white bars) was evaluated in pericarp, perisperm and endosperm tissues. (E) Fruits at different developmental stages were detached and incubated with $^{14}\text{CO}_2$ to determine the

distribution of radioactivity in each tissue.

this tissue. Such conversions also occurred in the pericarp where the same specific radioactivity was found in sucrose and reducing sugars when ^{14}C -fructose was used in the feeding experiment.

In a third feeding experiment, fruits at different developmental stages were detached and incubated with

CO_2 (Fig. 4E). These data show that even during its disappearance with fruit growth, the perisperm retains its role as a transit tissue. Fruit photosynthesis also sharply decreases with the maturation of coffee fruits, as suggested by the gradual decrease of radioactivity in all tissues, mainly in the pericarp.

Histological study of coffee fruits

Tissue organization and evolution was analysed by histological sections of fruits at different developmental stages (Fig. 5A–D). At 40 DAF, the perisperm constituted the main tissue of the fruit and the endosperm was not apparent (Fig. 5A). The latter began to develop internally to the perisperm between 60 and 75 DAF (Fig. 5B). At the mature stage (205–234 DAF), the endosperm filled the entire inner space of the locule while the perisperm was reduced to a few cell layers surrounding the endosperm (Fig. 5C). Throughout development the perisperm always appeared tightly connected to the endocarp by the funicule (pedicel). At the funicule/perisperm boundary, a symplastic continuity was observed with xylem and phloem vascular tissues entering directly in contact with the perisperm. These vascular tissues were not observed within the perisperm or endosperm tissues. Also, no vascular connection was observed between the pericarp and the perisperm. The endocarp is a thick cellulosic tissue (Fig. 1C) which is present from the beginning of fruit formation and seems to provoke the isolation of the perisperm. Therefore, if some vascular connection between pericarp and perisperm truly exists, it could only be through the peduncle. Whatever the developmental stage, the perisperm surface facing the endocarp had an epiderm formed by a cuticle-like layer

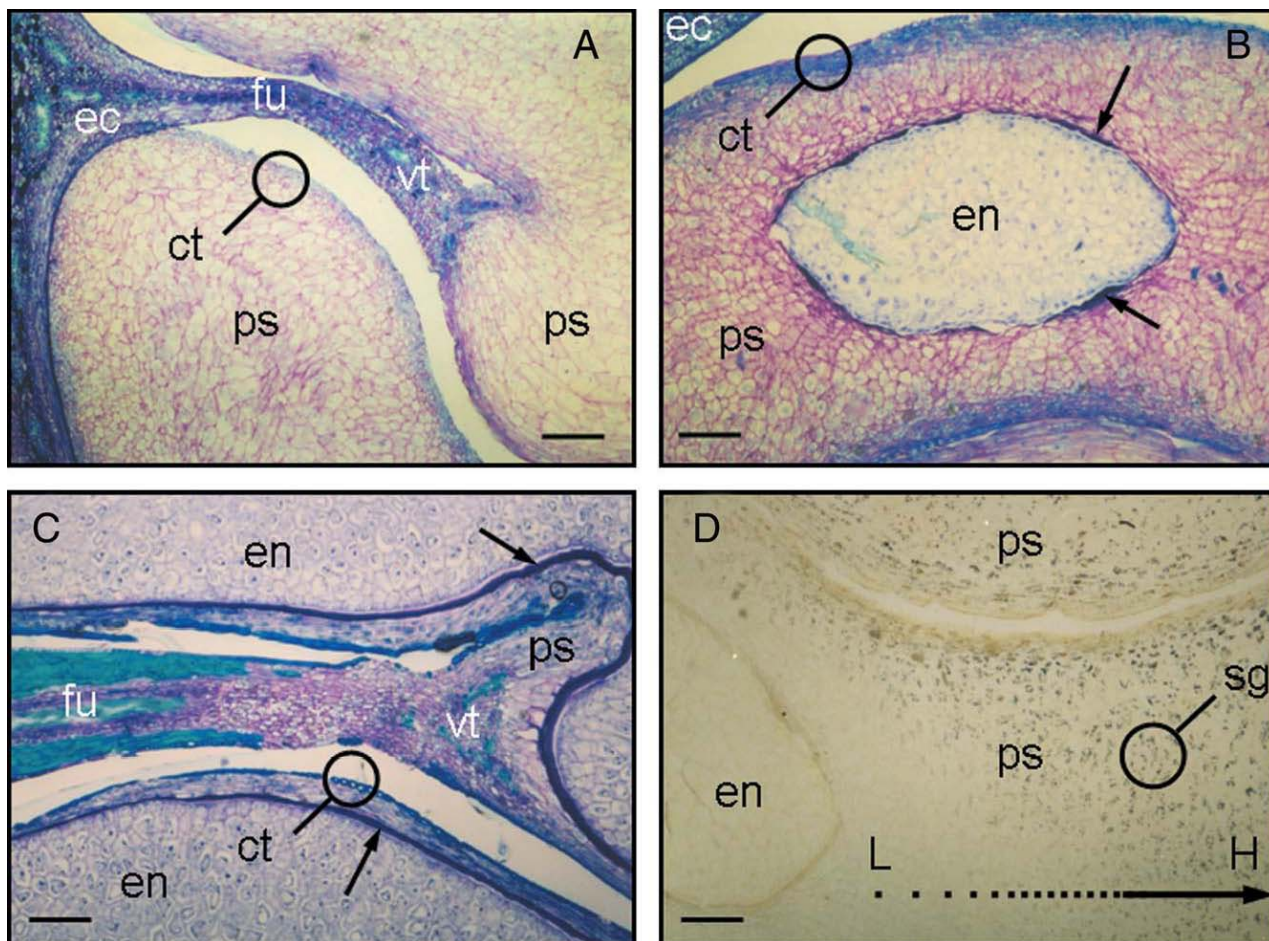


Fig. 5. Histological analysis of coffee fruits at different stages of ripening. Fruits at 40 DAF (A), 60–75 DAF (B, D), and 205–234 DAF (C) were stained to show the endocarp (ec), perisperm (ps), the endosperm (en), the vascular tissue (vt) located in the funicle (fu) and the cuticle-like layer (ct) of the perisperm. Black arrows show cells at the interface between perisperm and endosperm. (D) Starch granules (sg) revealed by Lugol's iodine coloration are indicated. A dashed arrow indicates the starch gradient in the perisperm from low (L) to high (H) content, respectively in regions close to and distant from the endosperm. Bars represent 200 μ m (A, C, D) and 80 μ m (B).

(Fig. 5A–C). It could also be observed that perisperm cells in contact with endosperm cells lose their shape, indicating that they are undergoing important changes supposedly ending in cell death (see black arrows in Fig. 5B and C), since at the end of fruit development the perisperm is reduced to a few cell layers (Fig. 5C). Lugol's iodine staining also showed that young perisperm tissue (60–75 DAF) contained starch granules that were no longer observed in the regions close to the growing endosperm (Fig. 5D).

Analysis of CaSUS1 and CaSUS2 cDNA sequences

The CaSUS1cDNA is 2979 bp long containing a 188 bp 5' untranslated region, a 293 bp 3' untranslated region including a putative poly(A) addition signal site (TAATAA) located 18 bases upstream of a polyA tail of 77 adenosine residues. It also has a single open reading frame coding for a protein of 806 amino acids with a theoretical molecular mass of 92.5 kDa and an estimated isoelectric point (pI) of 6.70. This protein contains a typical SUS motif (pfam00862) in its first 554 amino acid residues and a glycosyl transferase motif (pfam00534) in its C-terminal part (amino acids residues 565–727), confirming that it belongs to the SUS family. At the amino acid level, it shows high homology (95% with 89% of identity) with SUS deduced from the *Sus3-65* and *Sus4-16* genes of *Solanum tuberosum* (Fu and Park, 1995). In comparison with other SUS proteins, the CaSUS1 isoform contains a putative phosphorylation site LTRVHSLR (amino acid residues 6–13), with Ser-11 being the

probable site of this modification, and two hydrophobic domains of 21 amino acids (motif I: 269–289; motif II 675–695) that may be involved in the binding of this protein to membranes.

The CaSUS2full-length cDNA is 2889 bp long and contains 31 bp of 5' untranslated sequence, 377 bp of 3' untranslated sequence, a poly A tail of 45 adenosine residues and an open reading frame coding for a protein of 811 amino acids. The predicted molecular mass of CaSUS2 protein is 92.8 kDa with an estimated pI of 6.57. This protein shows high similarity to the SUS2 isoform from potato (AAO67719), CitSUSA from Citrusunshiu(BAA88904) and CpSS2 from the resurrection plant *Cratogeomys plantagineum*(Hochst.) (CAB38022) with 92%, 91%, and 90% similarity, respectively. The N-terminal putative phosphorylation site of CaSUS2 differed from the CaSUS1 sequence, but retained the Ser-11 amino acid residue. By comparison, these two coffee SUS isoforms showed only 68% of identity and 82% of similarity, therefore demonstrating that they are phylogenetically distant.

Isolation of the SUS2 gene from *C. arabica*

The genomic sequence of *C.arabica*for the CaSUS2gene was amplified by a PCR-reaction using primers localized at the extremities of its corresponding cDNA. Sequence analysis revealed that this gene contains 15 exons inter-

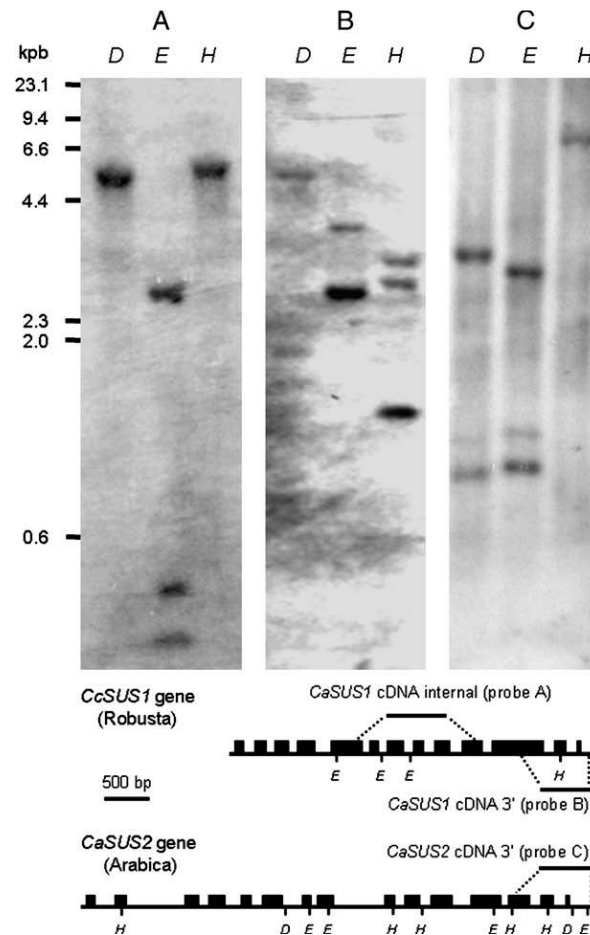


Fig. 6. Southern-blot analysis of *Coffea arabica* genomic DNA hybridized with CaSUS1 and CaSUS2 probes. Fifteen micrograms of genomic DNA digested with either *DraI*(D), *EcoRI* (E), or *HindIII* (H) restriction enzymes were fractionated by electrophoresis on 0.8% (w/v) agarose gel, and transferred to a nylon (Hybond-N⁺) membrane. Hybridizations were carried out with the probe A corresponding to a 667 bp internal fragment of CaSUS1cDNA (A), probe B corresponding to a 544 bp fragment overlapping the 3' region of CaSUS1cDNA (B), and probe C corresponding to a 589 bp fragment overlapping the 3' region of CaSUS2cDNA (C). Schematic organization of *CcSUS1*(Robusta; Leroy et al., 2005) and *CaSUS2*(Arabica, this study) genes are also presented (black boxes=exons), as well the localization of cDNA probes used. Molecular length standards are indicated at the left in kilobases.

rupted by 14 introns, all of them bordered by the 59-GT/39-AG consensus. Its structure was strictly identical to that observed for the group of dicot SUSA genes characterized by the split of exons 6 and 12 (Komatsu et al., 2002). Nucleic sequences of the CaSUS2gene in common with the CaSUS2cDNA appeared to be strictly identical, indicating that this gene truly encodes for the cloned cDNA.

Southern blot analysis

The structure and complexity of CaSUS1and CaSUS2genes in the *C.arabica*genome was examined by Southern blot analysis conducted using the probes A and B of CaSUS1cDNA and the probe C of CaSUS2cDNA (Fig. 6). In all cases, the hybridization patterns obtained were different, indicating that the probes were gene-specific under the stringent conditions used. For the internal probe of CaSUS1, single bands were observed with DraI (5.2 kb) and HindIII (5.8 kb) digestions, whereas three bands (2.6, 0.45, and 0.3 kb) were detected with the EcoRI digestion (Fig. 6A). These results were those expected from a comparison of the position of the probe with the restriction map of the CcSUS1gene from *C.canephora*(Leroy et al., 2005). When using the CaSUS1distal probe (Fig. 6B), the DraI fragment at 5.2 kb and the EcoRI fragment at 2.6 kb were conserved. This is to be expected considering that no restriction sites for these enzymes are supposed to exist in the CaSUS1gene. For the HindIII digestion, three bands were observed, a strong one at 1.5 kb and two others at 2.8 kb and 3.0 kb since only one HindIII restriction site is supposed to exist in the SUS1gene of *C.canephora*.

For CaSUS2, hybridization revealed a fragment of 6.4 kb when the Arabica genome was digested with HindIII (Fig. 6C). From the CaSUS2gene sequence and HindIII digestion, at least two bands should be expected: one around 400 bp and another greater than 560 bp. With EcoRI digestion, three signals were observed: one at 2.7 kb and two others at 1.3 (faint band) and 1.1 kb. For the DraI analysis, three bands were also revealed at 3.2 kb for the higher and 1.2 (faint) and 0.9 kb for the smaller. For these two digestions, only two bands should be expected as the probe overlapped a genomic region with only one EcoRI and DraI restriction site.

Expression of SUS genes in individual tissues of coffee fruits

Cherries were collected regularly between 30 DAF to 234 DAF. To analyse the expression of CaSUS1and CaSUS2genes, total RNA was extracted from entire fruits as well as individually from the pericarp (60–234 DAF), perisperm (60–176 DAF), and endosperm (118–234 DAF). CaSUS1transcripts of approximately 2.9 kb were strongly detected in the pericarp, with peaks at 60 and 147 DAF (Fig. 7B), and also at immature stages of perisperm (60–89 DAF) and endosperm (118–147 DAF) development (Fig. 7C, D). CaSUS1gene expression was not observed in the later stages of perisperm (118–176 DAF), pericarp and endosperm development (205–234 DAF). As expected, the CaSUS2mRNA was also approximately 2.9 kb. CaSUS2transcript levels were maximal at later stages of pericarp (205–234 DAF) and endosperm (234 DAF) development (Fig. 7B, D). Weak CaSUS2expression was also observed in the early stages (60 and 89 DAF) of perisperm development (Fig. 7C), as well as at 176 DAF. For both experiments, the hybridization pattern of entire fruits with CaSUS1and CaSUS2probes coincided quite well with those detected individually for each tissue (Fig. 7A).

Because the perisperm tissue was reduced to a thin membrane (silver skin) surrounding the endosperm (bean)

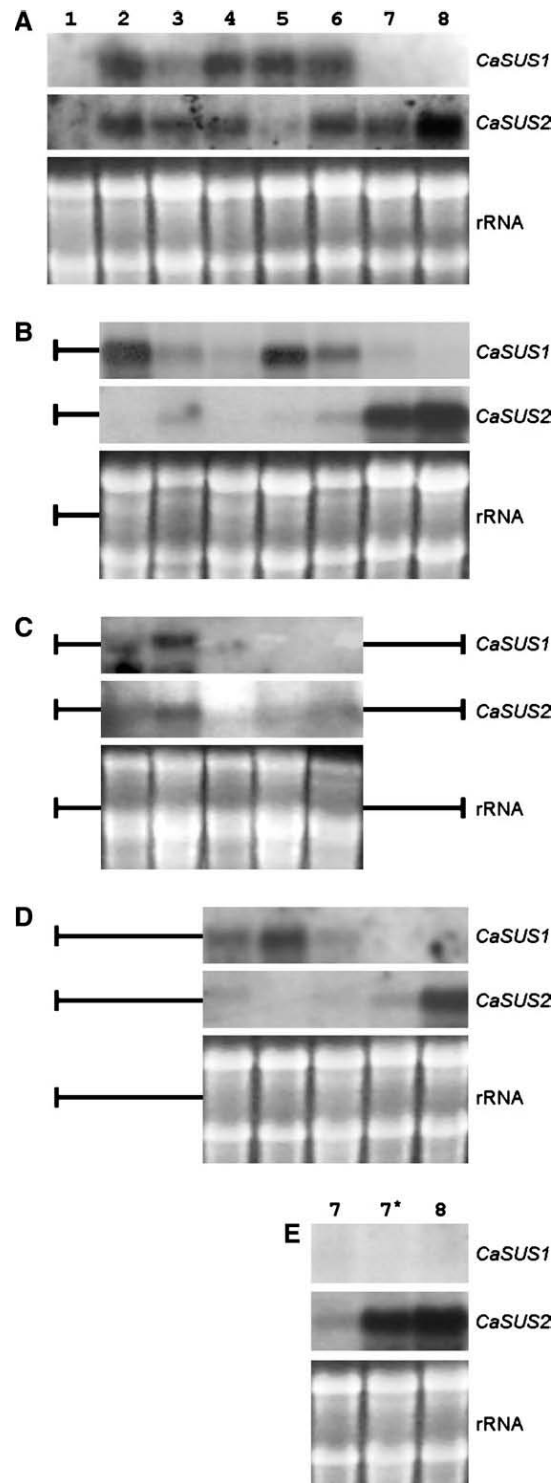


Fig. 7. Expression of *CaSUS1* and *CaSUS2* genes during coffee fruit development. Total RNA (15 lg) isolated from entire fruits (A) or from pericarp (B), perisperm (C), and endosperm (D) at regular developmental stages (lane 1, 30 DAF; 2, 60 DAF; 3, 89 DAF; 4, 118 DAF; 5, 147 DAF; 6, 176 DAF; 7, 205 DAF, and 8, 234 DAF) was separated in a formaldehyde-agarose gel and transferred onto a nylon membrane. (E) Hybridization of total RNA isolated from endosperm at 205 DAF with (lane 7*) or without (lanes 7 and 8) perisperm is also presented. Probes used correspond to probe A (*CaSUS1*) and C (*CaSUS2*). rRNAs stained by ethidium bromide were used to monitor the equal loading of RNA samples.

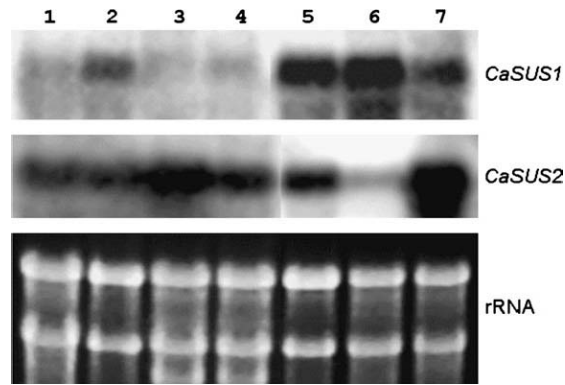


Fig. 8. Organ-specific expression of CaSUS1 and CaSUS2 genes. Total RNAs were extracted from young flower buds (lane 1), mature flower buds (lane 2), illuminated (distal) leaves with 10 cm length (lane 3), shaded (proximal) leaves with 10 cm length (lane 4), orthotropic stem (lane 5), entire fruit at 147 DAF (lane 6) and roots (lane 7) of *C. arabica* IAPAR 59. Probes used correspond to probe A (CaSUS1) and C (CaSUS2). rRNAs stained by ethidium bromide were used to monitor the equal loading of RNA samples.

at 205–234 DAF, it was not possible to extract RNA of sufficient quality for analysis by northern blot (see RNA degradation initiating in perisperm at 176 DAF). However, CaSUS2 transcripts were strongly detected at 205 DAF in RNA from the endosperm still surrounded by the perisperm membrane (lane 7* in Fig. 7E), but not in RNA extracted from endosperm without perisperm (lane 7 in Fig. 7E), showing that CaSUS2 transcription also occurred at the later stages of perisperm development.

Expression of SUS genes in coffee tissues

CaSUS1 and CaSUS2 gene expression was also investigated in various tissues of *C. arabica* (Fig. 8). CaSUS1 expression was barely detectable in young flower buds and leaves whatever their localization in plagiotropic stems. Transcripts of this isoform were observed in old flower buds and roots, and accumulated to a high level in stems. CaSUS2 expression was low in flower buds and mature (opened) flowers. High CaSUS2 gene expression was observed in roots and in light-exposed leaves (positioned at the terminal ending of the branch). CaSUS2 mRNA levels were moderate in stems and shaded leaves (collected inside the plant) and low in flowers whether young or mature. As an internal control, high expression of CaSUS1 in entire coffee fruits at 147 DAF and the absence of CaSUS2 mRNAs at the same time (see lane 5 in Fig. 7A) was confirmed.

Discussion

Sugar partitioning during coffee fruit development

In higher plants, sugar metabolism has been shown to be essential for the control of seed development, mainly through the regulation of the source/sink process (Herbers and Sonnewald, 1998). For example, the high ratio of hexoses (H) to sucrose (S) observed in embryos of *Vicia faba* characterize the phase of intensive cell division (Weber et al., 1998). The transition of the pre-storage phase to the maturation (storage) phase, when cell elongation and differentiation occur, is characterized by a clear switch in carbohydrate state, from a high to low H/S ratio. In sink organs of most plant species, these changes are controlled by the sucrose-cleaving enzymes like invertase, which has several isoforms differing in their biochemical properties and cellular localization, and SUS (Sturm and Tang, 1999). While invertase only functions in the direction of sucrose hydrolysis, SUS is a reversible enzyme capable of degrading and synthesizing sucrose. In this study, high H/S ratios coincided with the expansion phases of fruit tissues, as in the perisperm at 89 DAF, the endosperm between 118–147 DAF, and the pericarp between 205–234 DAF (Fig. 2). In the perisperm, the transition from a high to a low H/S ratio also corresponded to its gradual disappearance and to the beginning of endosperm growth. The same was observed in the endosperm where transition from a

high to low H/S ratio coincided with the end of volume increase and the beginning of the storage phase (Rogers et al., 1999a). In this regard, high hexose contents should control perisperm and endosperm expansion by creating a hydrostatic pressure gradient, thereby enabling mass flow of water and nutrients into these tissues (Herbers and Sonnewald, 1998).

In the perisperm, the highest concentration of reducing sugars was observed at 89 DAF (Fig. 2C) while maximal AI activity was found at 60 DAF (Fig. 3A). No particular variations of SUS activity were observed at this period. However, in part, these reducing sugars could come from starch degradation, as indicated by the histological study of young (60–75 DAF, Fig. 5D) perisperm (see below), but not apparently from the cleavage of sucrose imported from the leaves or pericarp. Maximal SPS activity in the perisperm and endosperm tissues was detected at 147 DAF, when the perisperm was in decline and the rapid growth phase of the endosperm terminated. Despite the generally held involvement of SPS in sucrose resynthesis, activities were not accompanied by sucrose accumulation in these tissues. However, they did overlap temporally with the synthesis of 11S storage proteins (Rogers et al., 1999a), the beginning of polysaccharide accumulation (Redgwell et al., 2003), and α -galactosidase activity (Marraccini et al., 2005), essential for galactomanan deposition in endosperm cell walls. Therefore, SPS activity detected here appeared to be well co-ordinated with the differentiation of the endosperm into storage tissue, as reported during cotyledon development of *Vicia faba* (Weber et al., 1996). Other evidence of a lack of relationship between sugar concentration and enzymatic activities was obtained with the pericarp (Fig. 3A), where maximal AI activity observed at 118 DAF was not followed by reducing sugar accumulation, as well as with the perisperm at 176 and 205 DAF (Fig. 3C) where no changes of reducing sugar and/or sucrose contents paralleled SUS activity. A similar but inverse situation was observed in the endosperm, where the high level of reducing sugars at 118 DAF was not accompanied by a significant increase of either AI and SUS activities. The degradation and (re)synthesis cycle of sucrose as well as the existence of rapid sugar transfers between the perisperm and endosperm tissues, rather than measurements of enzymatic activities *per se*, could explain these results (Nguyen-Quoc and Foyer, 2001). Such a complex interaction among tissues is also supported by

14

the pulse–chase experiments with 14 C-fructose and C-sucrose and the specific radioactivity of sucrose and reducing sugars found in the different tissues. In addition, the action of other sucrose-cleaving enzymes, for instance, neutral invertases (Hubbard et al., 1991) and the presence of enzymatic activities in tissues and compartments that are difficult to investigate, cannot be excluded. This might be the case of immature (0–60 DAF) perisperm where maximal AI activity was measured at 60 DAF (Fig. 3A) or with the endosperm which can be identified a few days after anthesis (De Castro and Marraccini, 2006), but can only be easily separated from the perisperm after 118 DAF. Finally, the presence of extracellular (apoplastically localized) invertase, facilitating sucrose transfers out of maternal tissues (Weber et al., 1997; Nguyen-Quoc and Foyer, 2001), could have been missed during tissue isolation.

By contrast, SUS activities detected in the pericarp and endosperm tissues between 176 and 234 DAF (Fig. 2D) were paralleled closely by sucrose accumulation in these tissues (Fig. 3C). In addition, the large accumulation of reducing sugars occurring in the pericarp at 205 and 234 DAF (Fig. 2C), also reported by Mariñ-López et al. (2003), might arise from the relatively high AI activity measured in this tissue (Fig. 3A). It could also result from the degradation of complex polysaccharides since transcripts of polygalacturonase (EC 3.2.1.15), that parallel those of ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) oxidase, were reported for late stages of pericarp maturation (Cacão et al., 2003; Pereira et al., 2005).

xa

The C partitioning and sugar exchanges existing between the perisperm, pericarp, and endosperm tissues of fruits was investigated by pulse–chase experiments with 14 C-labelled compounds (Fig. 4). In the experiment with 14 CO₂, incubation of leaves yielded more radioactivity in the perisperm than fruits exposed to 14 CO₂. This indicates that the pericarp retains most of the carbon assimilated *in loco*, while the carbon consumed by the endosperm comes predominantly from the leaves. Vaast et al. (2005) estimated that photosynthesis by the pericarp may account for approximately 30% of the total carbon allocated in the fruit. Perhaps this might be due in part to a lack of vascular connections between the pericarp and the other fruit tissues, as mentioned above. In this study, it is also shown that the pericarp contribution to

CO₂ assimilation decreased gradually with maturation, since less radioactivity was found in the tissues of mature (reddish) fruits exposed to ¹⁴CO₂ than in younger ones (Fig. 4E). Independently of the pathways used to transport sucrose between the different tissues of coffee fruits, these experiments highlight the existence of intensive exchange of sugars between fruit compartments which occur mainly through simultaneous biosynthetic and catabolic processes of sucrose metabolism.

Coffee fruit histology: role of the perisperm tissue during bean development

Coffee fruits have a quite peculiar tissue organization and development (De Castro and Marraccini, 2006). In *C. arabica*, the perisperm arises from the nucellus and constitutes the predominant tissue occupying the inner space (locule) of fruits until 90–100 DAF. This locule space is delimited by the endocarp (also called the parchment layer; Fig. 1C), which is a hard and cellulose-rich tissue present from the early stages of fruit development. As the fruit grows, this space is rapidly occupied by the endosperm while the perisperm, at this point referred to as the silver skin, becomes a thin tissue reduced to few cell layers surrounding the endosperm.

For the first time, the histological study presented here clearly reveals the connections existing between these tissues. This identified the presence of vascular tissues originating in the central endocarp region and entering directly into contact with the perisperm exclusively by the funicle extremity (Fig. 5A). This situation persists during further fruit development, even when the perisperm is reduced to the silver skin. The epiderm of the perisperm facing the endocarp also contains cell layers showing a modified cell wall structure and probably undergoing death. At the moment, it is not known whether this particular differentiation would favour or impede solute exchanges. Whatever the situation, the continuity observed between vascular tissues of the funicle and the perisperm indicate the symplastic unloading of photosynthates from the sieve tube (Patrick and Offler, 1995) to the perisperm and subsequent diffusion within this tissue.

At early and late developmental stages, a cuticle-like layer was also detected on the surface of the perisperm facing the endocarp, but not on the perisperm side facing the endosperm. By analogy with the structure and function of other plant seeds, this cuticle should form an impermeable barrier to apoplastic transfers by isolating a sector of the seed apoplast from the perisperm and preventing solute delivery by passive (diffusion) mechanisms (see review by Patrick and Offler, 1995). Finally, the large number of plasmodesmata present in endosperm cells (see review by De Castro and Marraccini, 2006) argues for simple diffusion or symplastic transfer of solutes in this tissue.

Histological studies also revealed the presence of starch granules in the perisperm (60–75 DAF; Fig. 5D), but not in the cells closer to the endosperm, suggesting starch hydrolysis in this particular region. This disappearance of starch could also explain the peak of reducing sugars detected in the perisperm at 89 DAF. When transferred into the endosperm, reducing sugars could provide the energy necessary for cell division and elongation and function as precursors for the synthesis of storage protein and polysaccharides. Previous observations also indicate the function of the perisperm as a tissue capable of providing the endosperm with additional precursors, such as organic acids for the synthesis of chlorogenic acids (Rogers et al., 1999b).

The investigation also shows that the role of the perisperm is not limited to transient accumulation of biochemical precursors. Even when reduced to a thin membrane at 205 DAF, the results presented here clearly demonstrate that the perisperm retained the capacity to transcribe genes, such as *CaSUS2* for example (Fig. 7E), and to retain *SUS* enzymatic activities (Fig. 3C). Taken together with the results of the pulse–chase experiments, these data clearly demonstrate the important function of the perisperm tissue in bean development.

Two isoforms of sucrose synthase are expressed in coffee fruits

The coincidence of *SUS* activities and sucrose accumulation observed in pericarp and endosperm tissues between 176 and 234 DAF (Figs 2D, 3C) led to the performance of an in-depth study of the molecular characteristics of *SUS*. The use of EST sequence data available from the Brazilian Coffee Genome Project allowed the isolation of two *SUS*-encoding cDNAs of similar size, but differing in the

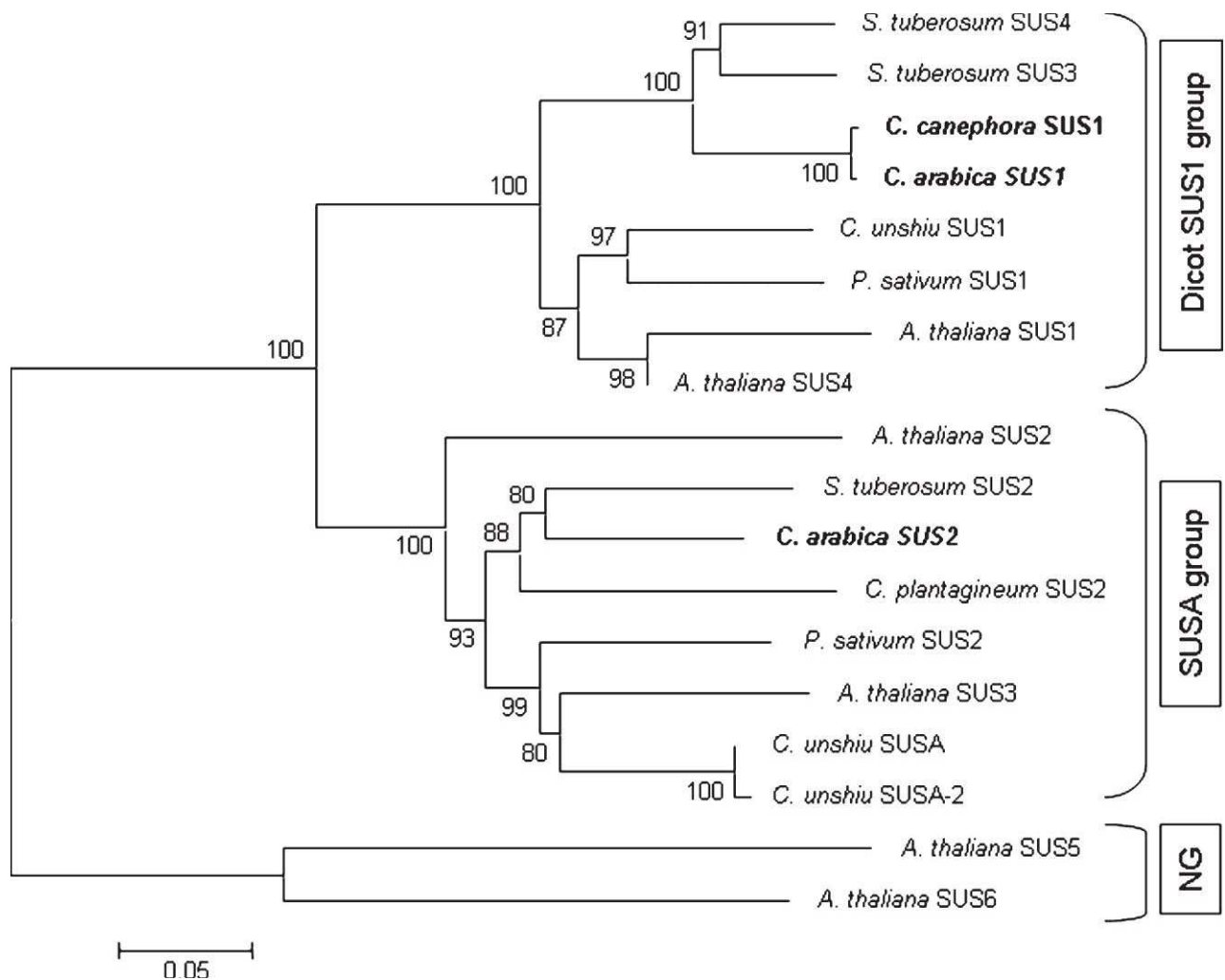


Fig. 9. Comparison of deduced amino acid sequences of plant sucrose synthase. The phylogenetic dendrogram was generated by multi alignment using CLUSTALW based on identity and the Neighbor-Joining method with Poisson correction. Bootstrap values are shown as percentages. EMBL database accession numbers of SUS proteins are as follows: ArabidopsisthalianaSUS1 (NP197583), SUS2 (NP199730), SUS3 (NP192137), SUS4 (AAK59464), SUS5 (NP198534), SUS6 (NP177480); CitrusunshiuSUSA (BAA88904), SUSA-2 (BAA88981), SUS1 (BAA88905); CoffeearabicaSUS1 (CAJ32596), SUS2 (CAJ32597); CoffeacanephoraSUS1 (CAI56037); CraterostigmaplantagineumSS2 (CAB38022); PisumsativumSUS1 (CAA09910), SUS2 (CAA04512); SolanumtuberosumSUS2 (AAO67719), SUS3 (U24088), SUS4 (U24087).

primary sequence of the proteins they encode. The deduced amino acid sequence of the CaSUS1cDNA showed a high degree of similarity with SUS of the Dicot SUS1 group (Fig. 9) frequently identified in sink organs of other plant species, as with SUS3, SUS4 from potato tubers (Fu and Park, 1995), and SUS1 from pea seed coat (De´jardin et al., 1997) and citrus fruit (Komatsu et al., 2002). By contrast, the deduced amino acid sequence of CaSUS2cDNA presented high sequence similarity with SUS of the dicot SUSA group, such as SUSA from C.unshiu(Komatsu et al., 2002). This protein also showed relatively high identity (82%) and homology (90%) to the SS2 protein coded by the CpSS2(AJ132000) gene from the resurrection plant Craterostigmaplantagineum(Kleines et al., 1999). At the amino acid level, the SUS1 and SUS2 proteins shared only 68% of identity and 82% of similarity, therefore agreeing with the existence of two differentially expressed and non-allelic loci for this enzyme in coffee. The phylogenetic organization of coffee sucrose synthases into at least two distinct groups was reinforced by the comparison of SUS-encoding genes (Fig. 9). Indeed, the structure of the previously reported CcSUS1gene of C.canephora(Leroy et al., 2005) clearly differed from the SUS2gene of C.arabicadescribed here, mainly by the split of the exons 5 and 11 observed in the latter, but not in the former. In this regard, the organization of the coffee CcSUS1gene is similar to that of the AtSUS1and

CitSUS1 genes, respectively, from *A. thaliana* and *C. unshiu*, whereas that of the CaSUS2 appeared to be close to the genes belonging to the dicot SUSA group (Komatsu et al., 2002; Baud et al., 2004).

At the nucleic acid level, CaSUS1 cDNA from *C. arabica* (this study) presented 18 differences over the 2421 bp of the protein coding sequence of the CcSUS1 gene from *C. canephora* (Leroy et al., 2005). Fifteen of them were silent and did not modify the final amino acid sequence of the SUS1 protein; two others were considered as neutral (F₅₃₂ and R₆₆₃ in CaSUS1 changed, respectively, by Y and K amino acid residues in CcSUS1) and only one led to a radical amino acid change (G₂₅₉ in CaSUS1 changed E in CcSUS1). None of these changes affected the N-terminal phosphorylation site, the putative hydrophobic domains, or the theoretical pI of the proteins and 59 and 39 untranslated regions, suggesting that these sequences were highly conserved during evolution.

In comparison with the CcSUS1 gene sequence published for *C. canephora* (Leroy et al., 2005), the Southern blot analysis performed with the distal probe of the CaSUS1 revealed additional bands (Fig. 6B, lines E, H). The same was observed when using the CaSUS2 probe overlapping the 39 untranslated region of this cDNA (Fig. 6C). Because

C. arabica is amphidiploid resulting from a natural cross between diploid species *C. eugenoides* and *C. canephora* (Lashermes et al., 1999), these patterns could characterize sequence divergence in the 39 regions of independent SUS1 and SUS2 genes coming from each parent. Alternatively, they could correspond to hybridization of the probe with more distant SUS-encoding genes. Whatever the possibility, the simple patterns obtained suggest that CaSUS1 and CaSUS2 genes were probably unique in the *Arabica* genome. Sequence alignment of full-length CaSUS1 cDNA with a partial SUS1 cDNA (AJ575256) previously amplified by RT-PCR using degenerated primers deduced from conserved SUS domains (Marraccini et al., 2003), revealed eight differences. Interestingly, all of them affected the third base of codons, without modifying the amino acid composition of the deduced SUS1 protein. Since both CaSUS1 cDNA sequences were amplified from the same cultivar (IAPAR 59) of *C. arabica* and verified by double-strand sequencing, this suggests that they originated from different alleles of the CaSUS1 gene.

CaSUS1 and CaSUS2 genes are differentially expressed and may assume different functions

Transcripts of CaSUS1 were abundant in the pericarp at 60 and 147 DAF. They were also high at the immature stage of perisperm and endosperm development and decreased towards the ripening stage. By contrast, mRNA levels of CaSUS2 were undetectable in young endosperm and barely detectable in young pericarp and perisperm, but increased towards the ripening of pericarp and endosperm tissues. The high CaSUS2 gene expression observed at 205 and 234 DAF in the pericarp and at 234 DAF in the endosperm overlapped perfectly the peaks of SUS activity and sucrose concentration measured at the latest developmental stages of these tissues. The differential expression of CaSUS1 and CaSUS2 genes presented here showed great similarities, respectively, with the expression profiles of CitSUS1 and CitSUSAgene of *C. unshiu* (Komatsu et al., 2002). In this species, the CitSUS1 gene was expressed early in the development of peel and edible tissues, whereas CitSUSAw was expressed in the latest developmental stages of these tissues (Komatsu et al., 2002). In addition, sucrose accumulation and SUS activity coincided quite well with the CitSUSAw expression profile and to a lesser extent that of CitSUS1.

In coffee, mRNA levels of CaSUS1 detected in the pericarp and in the early stages of perisperm and endosperm development were not accompanied by SUS activity or particular alterations of sucrose or reducing sugar contents. Even when SUS enzymatic assays were tested in the direction of sucrose degradation, no SUS activity was detected at the time of CaSUS1 gene expression (data not shown). However, western blot analysis using antibodies raised against the SUS1 isoform of pea teguments (De´jardin et al., 1997) clearly identified a SUS protein in the endosperm at 118–147 DAF (Fig. 3D), that probably corresponds to the CaSUS1 protein. This is also supported by the phylogenetic dendrogram, where both proteins clustered in the Dicot A group (Fig. 9) and by the perfect overlapping of the western blot and CaSUS1 gene expression in the endosperm (Fig. 7D). The absence of SUS activity coincident with CaSUS1 gene expression could be explained by the necessity of post-translational modifications as shown in soybean, where the binding of ENOD40 peptide A to SUS was required to activate sucrose-cleaving activity at the early stage of root nodule organogenesis (Rohrig et al., 2004).

At the phylogenetic level, the CaSUS2 isoform was classified in the SUSA group of plant SUS (Fig.

9) which also contains the proteins coded by the AtSUS2 and AtSUS3 genes of *Arabidopsis thaliana* and CpSS2 from the resurrection plant *C. plantagineum* (Komatsu et al., 2002; Baud et al., 2004). In the former species, the AtSUS2 gene was considered as a marker of seed maturation since its maximal expression was detected in seeds at 12 DAF and decreased towards maturation. By contrast, AtSUS3 transcripts were not detected before 12 DAF, but increased steadily after this time and also paralleled the sucrose accumulation observed during the late-maturation phase (Baud et al., 2002). In addition, AtSUS3 expression was up-regulated under dehydration, such as in leaves submitted to water deprivation (Baud et al., 2004). This could explain its high expression in the late-maturation phase of seed development where intense desiccation was reported (Baud et al., 2002). Interestingly, the CaSUS2 isoform also had great similarity with the SUS protein of CpSS2 gene from *C. plantagineum*, whose expression increased in roots submitted to water depletion (Kleines et al., 1999). Although effects of water stress on SUS gene expression were not studied in the present investigation, the endosperm dehydration observed during the latest stages of endosperm development (De Castro et al., 2005) or in roots of field-grown coffee plants (Fig. 8), could explain the high levels of CaSUS2 transcripts detected in these tissues.

Whatever the situation, the high CaSUS2 gene expression in pericarp and endosperm reported here argue strongly for an important role of this gene in sucrose accumulation in these tissues. This should be confirmed by comparing SUS activities and CaSUS2 gene expression in endosperms of Arabica (this study) and Robusta species that differ in their sucrose content (Ky et al., 2001; Campa et al., 2004). Such experiments are underway. In addition, the importance of CaSUS2 in cup quality through a control of sucrose metabolism is being verified by growing coffee trees under shade and also by reducing the number of fruits on the tree. In both cases it is known that cup quality is improved.

Acknowledgements

We are grateful to Dr Alan C Andrade and Felipe Vinecky (EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brazil) for their help in sequencing of CaSUS1 and CaSUS2. We also thank Dr C Rochat (INRA, Versailles, France) for providing the polyclonal antibody serum against SUS from pea and Dr Ladaslav Sodek for reviewing the text. This project was supported by the Brazilian Consortium for Coffee Research and Development (CBP&D-Café). P Marraccini received financial support (DCSUR-BRE-4C5-008) from the French Embassy in Brazil. C Geromel and AA Cavallari received student fellowships from CAPES-Brazil and FAPESP-São Paulo, respectively, and P Mazzafera received a research fellowship from CNPq. The CaSUS1 and CaSUS2 cDNA and the CaSUS2 gene sequences were deposited in the EMBL/GenBank database under the accession numbers AM087674, AM087675, and AM087676 respectively.

References

- Amor Y, Haigler C, Johnson S, Wainscott M, Delmer D. 1995. A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 92, 9353–9357.
- Baud S, Boutin J-P, Miquel M, Lepiniec L, Rochat C. 2002. An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 151–160.
- Baud S, Vaultier MN, Rochat C. 2004. Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 55, 397–409.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Cacão SMB, Galvão RM, Pereira LFP, Vieira LGE. 2003. *Identificação e caracterização de genes de poligalacturonase de Coffea arabica*. III. Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, Porto Seguro, 98–99.
- Campa C, Ballester JF, Doulbeau S, Dussert S, Hamon S, Noirot M. 2004. Trigonelline and sucrose diversity in wild *Coffea* species. *Food Chemistry* 88, 39–44.
- Casal S, Oliveira MB, Ferreira MA. 2000. HPLC/diode-array to the thermal degradation of trigonelline, nicotinic acid, and caffeine in coffee. *Food Chemistry* 68, 481–485.
- De Castro RD, Estanislau WT, Carvalho MLM, Hilhorst HWM.

2005. Functional development and maturation of coffee (*Coffea arabica*) fruits and seeds. *Proceedings of the 20th International Scientific Colloquium on Coffee*, Bangalore, International Scientific Association on Coffee, Paris, 619–635.
- De Castro R, Marraccini P. 2006. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18, 175–199.
- De Maria CAB, Trugo LC, Moreira RFA, Werneck CC. 1994. Composition of green coffee fractions and their contribution to the volatile profile formed during roasting. *Food Chemistry* 50, 141–145.
- De'jardin A, Rochat C, Maugenest S, Boutin J-P. 1997. Purification, characterization and physiological role of sucrose synthase in the pea seed coat (*Pisum sativum* L.). *Planta* 201, 128–137.
- Dubois MK, Giller KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith T. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 360–356.
- Fu H, Park WD. 1995. Sink-and vascular-associated sucrose synthase functions are encoded by different gene classes in potato. *The Plant Cell* 7, 1369–1385.
- Gerrits PO, Smid L. 1983. A new, less toxic polymerization system for the embedding of soft tissues in glycol methacrylate and subsequent preparing of serial sections. *Journal of Microscopy* 132, 81–85.
- Grosch W. 2001. Volatile compounds. In: Clarke RJ, Vitzthum OG, eds. *Coffee: recent developments*. Oxford: Blackwell Science, 68–89.
- Herbers K, Sonnewald U. 1998. Molecular determinants of sink strength. *Current Opinion in Plant Biology* 1, 207–216.
- Homma S. 2001. Non-volatile compounds, part II. In: Clarke RJ, Vitzthum OG, eds. *Coffee: recent developments*. Oxford: Blackwell Science, 50–67.
- Hubbard NL, Pharr DM, Huber SC. 1991. Sucrose phosphate synthase and other sucrose metabolizing enzymes in fruits of various species. *Physiologia Plantarum* 82, 191–196.
- Johansen DA. 1940. *Plant microtechnique*. New York: McGraw-Hill.
- Kleines M, Elster RC, Rodrigo MJ, Blervacq AS, Salamini F, Bartels D. 1999. Isolation and expression analysis of two stress-responsive sucrose-synthase genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* (Hochst.). *Planta* 209, 13–24.
- Komatsu A, Moriguchi T, Koyama K, Omura M, Akihama T. 2002. Analysis of sucrose synthase genes in citrus suggests different roles and phylogenetic relationships. *Journal of Experimental Botany* 53, 61–71.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignments. *Briefings in Bioinformatics* 5, 150–163.
- Ky CL, Louarn J, Dussert S, Guyot B, Hamon S, Noirot M. 2001. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chemistry* 75, 223–230.
- Lashermes P, Combes M-C, Robert J, Trouslot P, D'Hont A, Anthony F, Charrier A. 1999. Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular Genetics and Genomics* 261, 259–266.
- Leroy T, Marraccini P, Dufour M, et al. 2005. Construction and characterization of a *Coffea canephora* BAC library to study the organization of sucrose biosynthesis genes. *Theoretical and Applied Genetics* 111, 1032–1041.
- Mari'n-Lo'pez SM, Arcila-Pulgarin J, Montoya-Restrepo EC, Olivero-Tasco'n CE. 2003. Cambios fı'sicos y quı'micos durante la maduracio'n del fruto de cafe' (*Coffea arabica* L. var. Colombia). *Cenicafe* 54, 208–225.
- Marraccini P, Rogers WJ, Allard C, Andre' ML, Caillet V, Lacoste N, Lausanne F, Michaux S. 2001. Molecular and biochemical characterization of endo-b-mannanases from germinating coffee (*Coffea arabica*) grains. *Planta* 213, 296–308.
- Marraccini P, Pereira LFP, Ferreira LP, Vieira LGE, Geromel C, Cavalari AA, Mazzafera P, Leroy T. 2003. *Coffea arabica* partial mRNA for sucrose synthase (*sus1* gene). EMBL/GenBank accession number AJ575256.
- Marraccini P, Rogers WJ, Caillet V, Deshayes A, Granato D, Lausanne F, Lechat S, Pridmore D, Pe'tiard V. 2005. Biochemical and molecular characterization of α -D-galactosidase from coffee beans. *Plant Physiology and Biochemistry* 43, 909–920.
- Nguyen-Quoc B, Foyer CH. 2001. A role for 'futile cycles' involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany* 52, 881–889.
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* 59, 368–373.
- Patrick JW, Offler CE. 1995. Post-sieve element transport of sucrose in developing seeds. *Australian Journal of Plant Physiology* 22, 681–702.
- Pereira LFP, Galva'õ RM, Kobayashi AK, Cac'õ SMB, xã Vieira LGE. 2005. Ethylene production and ACC oxidase gene expression during fruit ripening of *Coffea arabica* L. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 283–289.
- Redgwell RJ, Curti D, Rogers J, Nicolas P, Fischer M. 2003. Changes to the galactose/mannose ratio in galactomannans during coffee bean (*Coffea arabica* L.) development: implications for in vivo modification of galactomannan synthesis. *Planta* 217, 316–326.
- Rogers WJ, Be'zard G, Deshayes A, Meyer I, Pe'tiard V, Marraccini P. 1999a. Biochemical and molecular characterization and expression of the 11S-type storage protein from *Coffea arabica* endosperm.

- Plant Physiology and Biochemistry 37, 261–272.
- Rogers WJ, Michaux S, Bastin M, Bucheli P. 1999b. Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids, and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C. arabica*) coffees. *Plant Science* 149, 115–123.
- Röhrig H, John M, Schmidt J. 2004. Modification of soybean sucrose synthase by S-thiolation with ENOD40 peptide A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325, 864–870.
- Roitsch T, González M-C. 2004. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science* 9, 606–613.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Somogyi N. 1952. Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry* 195, 19–23.
- Sønderdal MR, Lauritis JA. 1992. Coffee. In: Hammerschlag FA, Litz RE, eds. *Biotechnology of perennial fruit crops*. Cambridge: CAB International, 401–420.
- Sturm A, Tang G-Q. 1999. The sucrose-cleaving enzymes of plant are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends in Plant Science* 4, 401–404.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673–4680.
- Van Handel E. 1968. Direct microdetermination of sucrose. *Analytical Biochemistry* 22, 280–283.
- Vaast P, Angrand J, Franck N, Dauzat J, Genard M. 2005. Fruit load and branch ring-barking affect carbon allocation and photosynthesis of leaf and fruit of *Coffea arabica* in the field. *Tree Physiology* 25, 753–760.
- Walkey JW, Tillman J. 1977. A simple thin layer chromatographic technique for the separation of mono and oligosaccharides. *Journal of Chromatography* 132, 172–174.
- Weber H, Borisjuk L, Wobus U. 1997. Sugar import and metabolism during seed development. *Trends in Plant Science Research* 2, 169–174.
- Weber H, Buchner P, Borisjuk L, Wobus U. 1996. Sucrose metabolism during cotyledon development of *Vicia faba* L. is controlled by the concerted action of both sucrose-phosphate synthase and sucrose synthase: expression patterns, metabolic regulation and implication for seed development. *The Plant Journal* 9, 841–850.
- Weber H, Heim U, Golombek S, Borisjuk L, Wobus U. 1998. Assimilate uptake and the regulation of seed development. *Seed Science Research* 8, 331–345.
- Yelle SRT, Chetelat RT, Dorais M, DeVerna JW, Bennett AB. 1991. Sink metabolism in tomato fruit. IV. Genetic and biochemical analysis of sucrose accumulation. *Plant Physiology* 95, 1026–1035.