

METABOLISMO DE AÇÚCARES DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS DE CAFÉ

Clara GEROMEL¹ E-mail: clarageromel@bol.com.br, Lucia P. FERREIRA², Aline A. CAVALARI¹, Luiz Filipe P. PEREIRA^{2,3}, Luiz Gonzaga E. VIEIRA², Thierry LEROY⁴, Paulo MAZZAFERA¹, Pierre MARRACCINI^{2,4}

¹ UNICAMP (Universidade de Campinas), Dept Plant Physiology-IB, CP6109,13083-970 Campinas, SP, Brasil; ² IAPAR – ³ EMBRAPA Café -, Lab. Biotecnol., CP481, 86047-902 Londrina, PR, Brasil; ⁴ Cirad CP / UMR PIA 1096 TA80 PS3, 34398 Montpellier Cedex 5, França.

Resumo:

Neste trabalho foi estudada, a sacarose sintase (Susy: EC 2.4.1.13) ao nível bioquímico e molecular durante o desenvolvimento de frutos de café. Os resultados sugerem que Susy é a principal enzima responsável pelo metabolismo da sacarose em frutos de café. Na polpa e no endosperma de frutos nos estádios finais de maturação, um pico de atividade de Susy foi observado e está correlacionado com um aumento de sacarose. Ao nível molecular, foram clonados cDNAs que codificam para duas isoformas diferentes de Susy. Também foi mostrado que ambos genes são expressos de forma diferente ao longo da maturação dos frutos. Ainda, experimentos de marcação com ¹⁴C- sacarose e incubação de frutos com ¹⁴CO₂ foram realizados. Estes experimentos mostraram que os açúcares não são transportados somente das folhas para os frutos, mas também há uma intensa comunicação entre os tecidos que compõem os frutos.

Palavras-chave: café, clonagem de cDNA, desenvolvimento do grão, expressão gênica, metabolismo da sacarose, sacarose sintase

SUGAR METABOLISM DURING COFFEE FRUIT DEVELOPMENT

Abstract:

In this study, we investigated the sucrose synthase (Susy: EC2.4.1.13) at the biochemical and molecular levels during the development of coffee fruits. Our results suggest that Susy is the main enzyme responsible for sucrose metabolism in coffee fruits. In the pulp and endosperm of fruits at the last stage of maturation, a peak of Susy activity was observed and correlates with an increase of sucrose. At the molecular level, we cloned two cDNAs encoding different Susy isoforms. We also showed that both Susy-encoding genes were expressed in coffee fruits, with differences regarding their spatial and temporal expression. In addition, feeding experiments with ¹⁴C-sucrose and incubation of fruits with ¹⁴CO₂ were carried out. These experiments showed that sugars are not only transported from the leaves to the fruits, but also there is an intense communication among the tissues composing the fruits.

Key words: bean development, cDNA cloning, coffee, gene expression, sucrose-synthase, sucrose metabolism

Introdução

Em frutos verdes, a fração de carboidrato representa aproximadamente metade do peso seco e participa de várias transformações químicas associadas à torrefação do café (Bradbury, 2001). Sacarose é considerada como o mais importante precursor do aroma e do sabor do café, pois é rapidamente degradada durante a torrefação. Apesar disso, pouco é conhecido sobre o metabolismo de açúcares em café, particularmente considerando que frutos de café demoram mais de 30 semanas para chegar à maturação. Portanto, o objetivo deste trabalho foi aumentar o conhecimento sobre o metabolismo de açúcares em café, principalmente a compreensão da relação fonte-dreno que ocorre entre os diferentes tecidos durante o desenvolvimento dos frutos de café.

Material e Métodos

Material Vegetal

Frutos de *Coffea arabica* cv IAPAR 59 foram colhidos de plantas no campo a cada quatro semanas da floração até a completa maturação (Set. 2002/ Abril 2003). Tecidos do fruto (perisperma, endosperma, polpa) foram separados e usados independentemente para extração do RNA total (Rogers *et al.*, 1999) ou foram submetidas a análises para açúcares e medidas de atividades enzimáticas. Além disso, folhas ou ramos com frutos foram expostos ao ¹⁴CO₂ (Carneiro *et al.*, 1999 – veja esquema na Figura 2) por 4 h e então coletados após 24 h. Frutos isolados foram marcados com ¹⁴C-sacarose e coletados após 24 h (Vitória e Mazzafera, 1999).

Determinação de Açúcar e Análises Enzimáticas

Extratos etanólicos foram utilizados para determinar açúcares solúveis por HPLC com detecção por pulso amperométrico ou por colorimetria (Buysse e Merckx, 1993; Van Handel, 1968). Atividade de Susy e concentrações de proteína foram determinadas de acordo com Craig *et al.* (1999) e Bradford (1976), respectivamente. Atividade de Susy foi medida por síntese de sacarose. Extratos etanólicos foram também obtidos em experimentos com ^{14}C para determinação da radioatividade total. Para determinar a repartição da radioatividade, os açúcares foram separados por HPLC usando um monitor de radioatividade.

Ácidos Nucléicos

Uma seqüência parcial de cDNA de SUS1 está disponível no GeneBank sob número de acesso AJ575256. Uma seqüência parcial de SUS2, ainda não depositada no GeneBank, foi também clonada. Para análises de expressão, foram realizados northern-blots com 15µg de RNA total (Rogers *et al.*, 1999). Membranas foram hibridizadas independentemente com sondas correspondentes aos cDNAs parciais de SUS1 e SUS2 marcadas com ^{32}P .

Resultados

Desenvolvimento do Fruto, Concentração de Açúcar e Distribuição de ^{14}C

A Figura 1A mostra o desenvolvimento dos tecidos durante o crescimento do fruto. Em todos tecidos analisados, açúcares redutores (AR, principalmente frutose e glicose) estão em quantidades maiores que a sacarose (Figura 1B e C), exceto nos estádios finais de desenvolvimento do endosperma (205 e 234 dias após a floração - DAF). A quantidade de AR foi particularmente importante no perisperma a 90 DAF, quando o endosperma era muito pequeno para ser separado. Após 90 DAF, a quantidade de AR no perisperma decresce rapidamente, concomitantemente com o crescimento do endosperma, onde não foram detectados AR de 120 a 234 DAF. Sacarose acumula gradualmente em 6% do peso seco até que a maturação esteja completa. AR foram detectados em baixas concentrações durante o desenvolvimento da polpa, mas aumentam rapidamente nos estádios finais de maturação, particularmente quando os frutos mudam de verde para vermelho, entre 205 e 234 DAF.

Ramos com frutos a aproximadamente 120 DAF foram incubados com $^{14}\text{C}\text{O}_2$. Os resultados mostraram que, além das folhas, o $^{14}\text{C}\text{O}_2$ é ativamente assimilado em frutos verdes devido à fotossíntese. Fotoassimilados (sacarose) são ativamente trocados em todos tecidos do fruto (Figura 2A). O maior acúmulo no perisperma mostra sua importância como um tecido de transferência. Frutos marcados com ^{14}C -sacarose mostram que, de fato, há um transporte da polpa para o endosperma (Figura 2B). Já na polpa, uma grande fração de sacarose foi convertida em AR (Figura 2C), o que confirma os dados apresentados na Figura 1. O mesmo foi observado em frutos incubados com $^{14}\text{C}\text{O}_2$ (dado não mostrado).

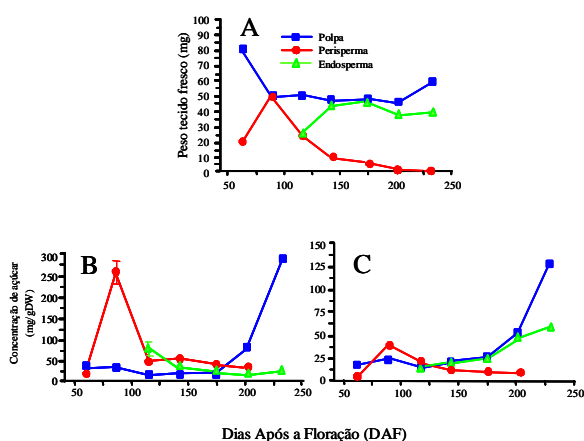


Figura 1. Crescimento dos Frutos (A) Açúcares Redutores (B) e Sacarose (C)

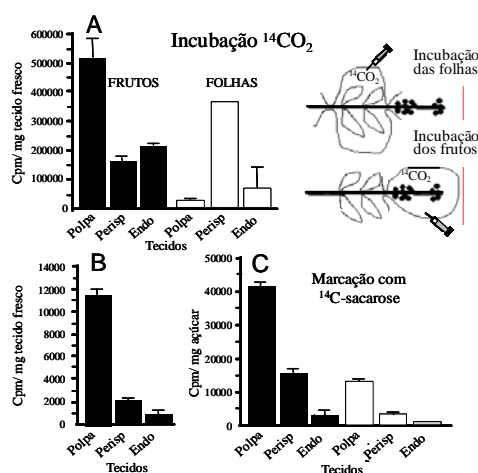


Figura 2. Distribuição de radioatividade em frutos de ramos incubados com $^{14}\text{C}\text{O}_2$ (A – veja esquema), em frutos marcados com ^{14}C -sacarose (B) e radioatividade específica de sacarose (preto) e açúcares redutores (branco) nesses frutos (C).

Isolamento de Seqüências de cDNA e gene de Susy

Uma seqüência parcial de cDNA de Susy (SUS1) foi clonada usando primers degenerados em experimentos de RT-PCR com RNA total de frutos de café. A proteína deduzida apresenta 97% de similaridade com a proteína SUS2 de *S. tuberosum* (P49039). Através da análise de Southern-blot foi possível observar que SUS1 é membro de uma pequena família de genes, contendo pelo menos dois genes (dado não mostrado). O cDNA inteiro (\cong 3kb) correspondente de *C. arabica* e o gene equivalente de *C. canephora* (\cong 4kb) foram recentemente clonados e estão sendo seqüenciados. Outra

seqüência parcial de cDNA (\cong 1kb), que codifica para sacarose sintase (nomeada SUS2), também foi identificada pelo Projeto Genoma Café e apresenta somente 59% de identidade com SUS1 a nível nucléico e 74% a nível protéico.

Atividade de Susy durante o Desenvolvimento do Fruto

Em todos os tecidos analisados, Susy parece ser sempre mais ativa que as invertases ácidas (dado não mostrado). Entretanto, como as análises de açúcar mostraram que não há acúmulo de sacarose durante a maior parte do desenvolvimento do fruto de café, por exemplo no perisperma, presume-se que a Susy funciona, provavelmente, como uma enzima que degrada a sacarose *in vivo*. O aumento da atividade da Susy nos estádios finais (205-234 DAF) de desenvolvimento da polpa e do endosperma foi simultaneamente acompanhado pelo aumento do teor de sacarose nestes tecidos. Isso sugere que essa enzima é responsável pelo acúmulo de sacarose nestes tecidos (Figura 3).

Expressão dos Genes de Susy

A expressão dos genes que codificam para as duas isoformas de Susy foi analisada em tecidos de frutos usando cDNA parciais de SUS1 e SUS2 como sondas (Figuras 3 e 4). RNAs mensageiros de SUS1 foram detectados no perisperma aos 90 DAF e não foram mais observados neste tecido. Para o endosperma, o pico de expressão de SUS1 ocorre aos 150 DAF e para polpa, dois picos de expressão são observados (aos 60 e 150 DAF). Além do mais, o gene de SUS2 somente se expressa nos estádios finais do desenvolvimento da polpa (200-230 DAF), sobrepondo o pico de atividade de Susy detectado neste tecido (Figura 4).

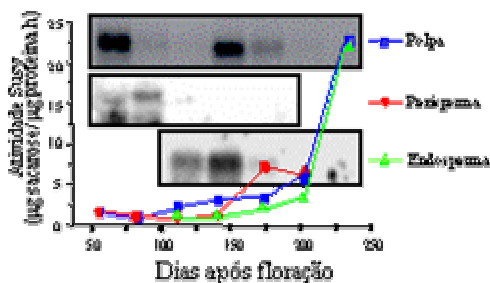


Figura 3. Atividades de Susy em tecidos separados de frutos de café. Expressão do gene de SUS1 (Northern-blot) também é apresentada.

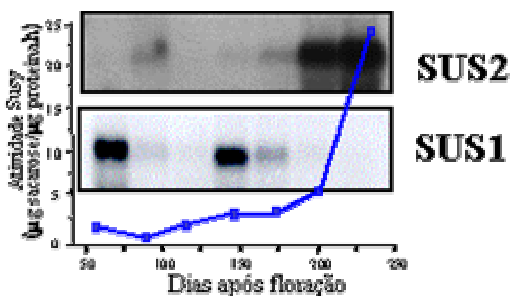


Figura 4. Expressão dos genes de SUS1 e SUS2 e atividade Susy (Figura 3) em polpa de café em desenvolvimento.

Discussão

Concentrações de AR e sacarose medidas nos tecidos do fruto confirmam as informações prévias obtidas em café (Rogers *et al.*, 1999). O dado apresentado de ^{14}C também mostra que a polpa tem um papel importante na fixação de CO_2 e que o perisperma parece se comportar como um tecido importante no transporte dos açúcares. Portanto, o decréscimo de AR no perisperma pode, também, ser devido à translocação para o endosperma. De fato, frutos incubados com ^{14}C -frutose mostraram uma rápida transferência para o endosperma (dado não mostrado).

Os resultados obtidos permitem deduzir que o acúmulo transitório de AR no perisperma e no endosperma é, provavelmente, mais uma consequência da função de degradação da sacarose sintase que da ação das invertases. Isto é sustentado pelo fato que não foi detectada expressão dos genes de invertase na polpa, no endosperma e no perisperma, enquanto que a expressão dos genes para Susy foi observada nesses tecidos. Também foi mostrado que pelo menos duas isoformas de Susy estão implicadas no metabolismo de sacarose em frutos de café. Neste sentido, propõe-se que a forma SUS1 funciona principalmente como uma enzima de degradação da sacarose no perisperma e no endosperma e que a SUS2 poderia controlar o acúmulo final de sacarose encontrada tanto na polpa quanto em frutos maduros de café.

Agradecimentos

Este projeto é apoiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café.

Referências Bibliográficas

Bradbury A.G.W. (2001) Chemistry I: Non-volatile compounds. In: Clarke R.J. and Vitzthum O.G. (Eds) Coffee: Recent Developments, Blackwell Science, Oxford, pp. 1-17.

- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 2: 248-254.
- Buysse J., Merckx R. (1993) An improved colorimetric method to quantify sugar content of plant tissue. *J. Exp. Bot.* 44: 1627-1629.
- Carneiro R.G., Ferraz L.C.C.B., Mazzafera P. (1999) Carbon partitioning in soybean infected with *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. *J. Nematology* 31: 348-355
- Craig J., Barrat P., Tatge H., Dejardin A., Barber L., Wang T., Hedley C., Martin C., Smith A.M. (1999) Mutations at the *rug4* locus alter the carbon and nitrogen metabolism of pea plants through an effect on sucrose synthase. *Plant J.* 17: 350-362.
- Rogers W.J., Michaux S., Bastin M., Bucheli P. (1999) Changes to the contents of sugars, alcohols, myo-inositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*Coffea arabica*). *Plant Sci.* 149: 115-123.
- Van Handel E. (1968) Direct microdetermination of sucrose. *Anal. Biochem.* 22: 280-283.
- Vitória A.P., Mazzafera, P. (1999) Xanthine degradation and related enzyme activities in leaves and fruits of two coffee species differing in caffeine catabolism. *J. Agric. Food Chem.* 47: 1851-1855.