

METABOLISMO DA SACAROSE EM CAFEIROS SUBMETIDOS A DIFERENTES NÍVEIS DE SOMBREAMENTO¹

Danielle Pereira Baliza²; Meline de Oliveira Santos³; José Donizeti Alves⁴; Rubens José Guimarães⁵; Rodrigo Luz da Cunha⁶, Vinicius Alves Pereira⁷

¹ Trabalho financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Instituto Nacional de Ciência e tecnologia do Café (INCT CAFÉ).

² Doutoranda, Agronomia-Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG, danibaliza@yahoo.com.br

³ Doutoranda, Agronomia-Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG, melineoli@hotmail.com

⁴ Professor, D.Sc., Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras- MG, jdalves@dbi.ufla.br

⁵ Professor, D.Sc., Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras- MG, rubensjg@dag.ufla.br

⁶ Pesquisador, D.Sc., Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), Lavras-MG, rlc@epamig.ufla.br

⁷ Graduando em Agronomia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG, viniciusalves111@hotmail.com

RESUMO: O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade das enzimas sacarose fosfato sintase, sacarose sintase e invertase ácida vacuolar em frutos, nos estádios de desenvolvimento verde, verde cana e cereja, de cafeeiros submetidos a diferentes níveis de sombreamento (pleno sol, 35, 50, 65 e 90% de sombra). Foram utilizadas quatro repetições, totalizando 20 parcelas, as quais foram constituídas por oito plantas úteis. Os tratamentos foram avaliados em relação às atividades das enzimas invertase ácida (IA), sacarose sintase (SuSy) e sacarose fosfato sintase (SPS) em frutos nos estádios de desenvolvimento verde, verde cana e cereja. Os frutos colhidos no sombreamento com 35% foram semelhantes aos frutos obtidos a pleno sol, em relação à atividade das enzimas invertase ácida e sacarose sintase, enquanto que os níveis com 50, 65 e 90% de sombra alteraram o padrão enzimático. Este comportamento demonstrou que o sombreamento a partir de 50%, provavelmente modificou o desenvolvimento do fruto, prolongando o período de maturação. Já em relação à SPS o sombreamento não alterou a sua atividade, sendo os maiores valores encontrados nos estádios verde cana e cereja.

Palavras-Chave: Invertase, SPS, sacarose sintase

SUCROSE METABOLISM IN COFFEE PLANTS SUBMITTED TO DIFFERENT LEVELS OF SHADE

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate the activity of enzymes sucrose phosphate synthase, sucrose synthase and vacuolar invertase acid in fruits, in the development stages green, green yellowish and cherry, coffee plants under different levels of shading (full sun, 35, 50, 65 and 90% shade). Four replications were used, totaling 20 plots, which consisted of eight plants. The treatments were evaluated in relation to the activities of acid invertase enzymes (IA), sucrose synthase (SuSy) and sucrose phosphate synthase (SPS) at the fruits in the development stages of green, green yellowish and cherry. Fruits at 35% shading were similar to those obtained in full sun fruit in relation to the activity of enzymes acid invertase and sucrose synthase, while levels of 50, 65 and 90% shade altered the enzyme pattern. This behavior showed that the shading from 50%, probably modified the development of the fruit, prolonging the maturation period. In relation to the SPS shading did not alter their activity, and the highest values found in green yellowish and cherry stages.

Key words: Invertase, SPS, sucrose synthase

INTRODUÇÃO

O cafeeiro (*Coffea arabica* L.) é originário das florestas tropicais da Etiópia, onde pode ser encontrado sob a proteção de árvores. Na América Central a utilização de sistemas agroflorestais na cafeicultura é uma técnica antiga e muito difundida. No Brasil, embora haja predomínio do cultivo a pleno sol, o uso de sistemas arborizados pode ser uma estratégia sustentável e economicamente viável principalmente aos pequenos agricultores que podem obter com esse tipo de cultivo melhores produtividades, além da renda alternativa das espécies arbóreas cultivadas com o cafeeiro (Morais et al., 2003; Kanten & Vaast, 2006; DaMatta et al., 2007; Gomes et al., 2008).

Nas folhas (local considerado como fonte), ocorre a síntese de carboidratos, os quais são translocados para os tecidos drenos na forma de sacarose (Leite et al., 2009). Este carboidrato desempenha papel crucial nas plantas, pois é uma molécula importante na distribuição de fotoassimilados e como fonte de carbono para manter o metabolismo da

célula e o crescimento e desenvolvimento. Esses processos são acompanhados, durante a vida do vegetal, por constantes mudanças nas relações fonte-dreno (Roitsch & González, 2004).

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, a sacarose é essencial para a qualidade da bebida, pois é um precursor de vários compostos químicos que participam do aroma e sabor (Geromel et al., 2006), 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 (SuSy: EC 2.4.1.13).

Invertases catalisam a hidrólise irreversível de sacarose em glicose e frutose e estão envolvidas em vários aspectos do ciclo de vida vegetal e de respostas aos estímulos ambientais (Roitsch & González, 2004). Em contrapartida, a SPS funciona no sentido da síntese de sacarose ($\text{UDP-glicose} + \text{frutose-P} \rightarrow \text{sacarose-P} + \text{UDP}$) enquanto que a SuSy catalisa uma reação reversível ($\text{UDP-glicose} + \text{frutose} \rightarrow \text{sacarose} + \text{UDP}$) (Sturm & Tang, 1999).

Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade das enzimas sacarose fosfato sintase, sacarose sintase e invertase em frutos, nos estádios de desenvolvimento verde, verde cana e cereja, de cafeeiros submetidos a diferentes níveis de sombreamento (pleno sol, 35, 50, 65 e 90% de sombra).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Setor de Cafeicultura do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), localizada no município de Lavras-MG, cujas coordenadas geográficas são: 21°14' S e 45° 00' W, com altitude média de 918 m. A temperatura média anual do ar dessa região é de 19,4°C e as médias anuais de temperatura, máxima e mínima de 26,1 e 14,8°C, respectivamente, com precipitação anual de 1.529,7 mm (Brasil, 1992). O clima da região é classificado, segundo Köppen, como do tipo Cwa, mas apresenta características de Cwb, com duas estações distintas: seca (abril a setembro) e chuvosa (outubro a março).

A cultivar de *Coffea arabica* utilizada foi Acaia Cerrado linhagem MG-1474. Os cafeeiros foram plantados no ano de 1998 no espaçamento de 3,5 m x 0,5 m e renovados por meio da recepa, em 2007. Após o início da primeira produção, no mês de maio de 2009, as plantas foram submetidas a cinco níveis de sombreamento (pleno sol e sob telas plásticas/sombrites de 35, 50, 65 e 90% de sombra). Foram utilizadas quatro repetições, totalizando 20 parcelas, as quais foram constituídas por oito plantas úteis. Os tratamentos foram avaliados em relação a atividades das enzimas invertase ácida (IA), sacarose sintase (SUS) e sacarose fosfato sintase (SPS) em frutos nos estádios de desenvolvimento verde, verde cana e cereja.

O material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido, utilizando tampão Hepes 100 mM, pH 7,0 contendo 2 mM MgCl₂, 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 30 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 açúcares redutores foram dosados pelo método de DNS (Miller, 1959). A composição do meio de reação para a SuSy 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).

Os tratamentos foram dispostos no delineamento de blocos casualizados (DBC). A análise de variância foi realizada e quando significativa, as variáveis foram submetidas ao teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade para o estudo das médias, utilizando o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas plantas cultivadas a pleno sol e com 35% de sombra houve comportamento semelhante em relação à atividade da enzima invertase ácida, em que os maiores valores foram obtidos no estádio verde, seguido dos demais estádios de desenvolvimento do fruto. Com o aumento do sombreamento aos níveis de 50 e 65% ocorreu um aumento da atividade desta enzima nos frutos colhidos no estádio cereja. Enquanto no maior nível de sombra (90%) as maiores médias foram encontradas nos estádios verde e verde-cana (Figura 1).

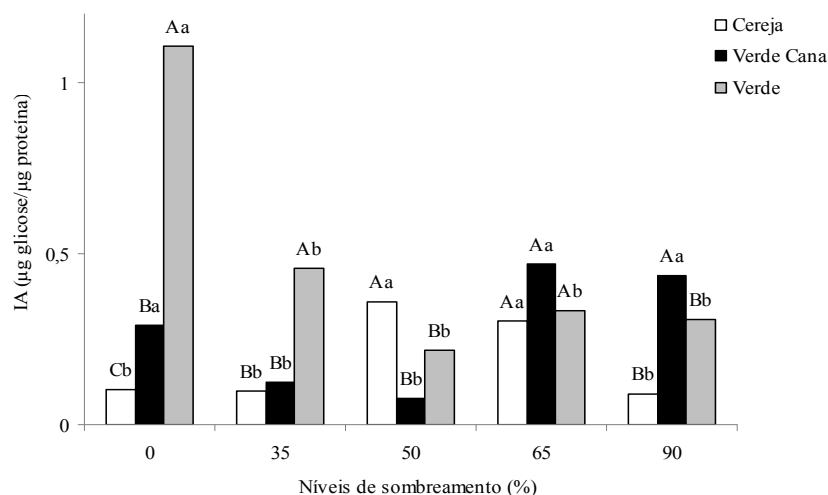


Figura 1 – Atividade da invertase ácida em frutos de cafeeiros em função dos níveis de sombreamento e estádios de maturação. Letras maiúsculas comparam médias entre os estádios de desenvolvimento dos frutos dentro de cada nível de sombreamento, enquanto letras minúsculas comparam as médias de cada estágio de desenvolvimento entre os níveis de sombreamento, com base no teste de Scott Knott a 5 %.

Para a atividade da SuSy não foi observada diferença significativa entre os estádios de desenvolvimento dos frutos colhidos a pleno sol e com 35 % de sombra. Já para os níveis de sombreamento com 50 e 65%, a maior atividade desta enzima foi apresentada pelo estágio verde-cana. Entretanto com maior nível de sombra os frutos no estágio de desenvolvimento cereja foram os que apresentaram maior atividade desta enzima (Figura 2).

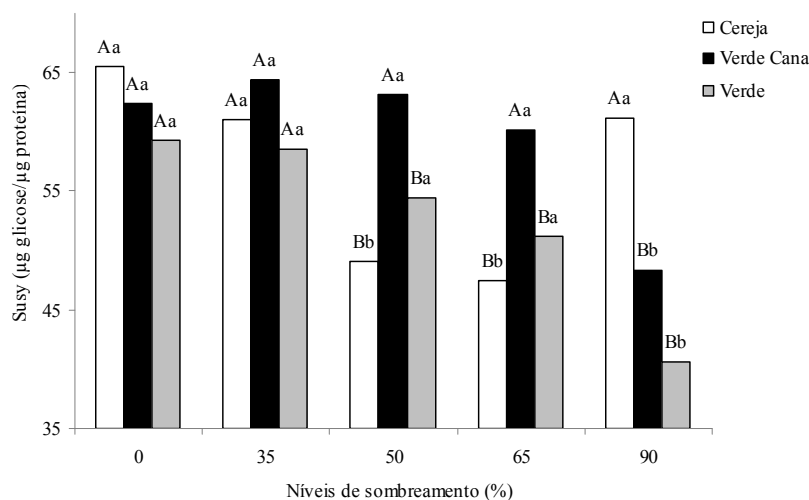


Figura 2 – Atividade da SuSy em frutos de cafeeiros em função dos níveis de sombreamento e estádios de maturação. Letras maiúsculas comparam médias entre os estádios de desenvolvimento dos frutos dentro de cada nível de sombreamento, enquanto letras minúsculas comparam as médias de cada estágio de desenvolvimento entre os níveis de sombreamento, com base no teste de Scott Knott a 5 %.

A alteração no comportamento das enzimas invertase ácida e SuSy demonstra que o sombreamento a partir de 50%, provavelmente alterou o desenvolvimento do fruto, prolongando o período de maturação (Muschler, 2001). Planta sombreada naturalmente ou artificialmente, pode fornecer grãos de café de melhor qualidade, favorecendo um lento amadurecimento e mais adequado enchimento dos grãos, além de mudanças nas composições químicas dos frutos (Vaast et al., 2006).

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). 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 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) 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.

A sacarose, subsequentemente, é sintetizada de novo no citoplasma pela SuSy e pela SPS (Miron & Schaffer, 1991; Dali et al., 1992). A atividade da SuSy em frutos diminui com o desenvolvimento, paralelamente a perda das conexões simplásticas e, eventualmente, acaba caindo abaixo dos níveis detectáveis no início da maturação (Robinson et al., 1988; Wang et al., 1993).

Em relação a atividade da enzima SPS verificou-se que ela não sofreu influência dos níveis de sombreamento, sendo que os maiores valores foram obtidos nos estádios mais tardios de desenvolvimento (cereja e verde-cana) (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores médios da atividade enzimática da sacarose fosfato sintase (SPS) em função dos estádios de maturação de frutos de cafeeiros.

Estádio de maturação	SPS (μg glicose/ μg proteína)
Cereja	56,36 a
Verde cana	56,40 a
Verde	51,30 b
Média	54,68

⁽¹⁾Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5 %.

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

A maior atividade da SPS nos estádios mais tardios de desenvolvimento do fruto pode estar relacionada ao fato da sacarose ser, em café, essencial para a qualidade da bebida, uma vez que é precursora de alguns compostos químicos que participam do aroma e sabor (Geromel et al., 2006).

CONCLUSÕES

Os frutos colhidos no sombreamento com 35% foram semelhantes aos frutos obtidos a pleno sol, em relação à atividade das enzimas invertase ácida e sacarose sintase, enquanto que os níveis com 50, 65 e 90% de sombra alteraram o padrão de atividade enzimática. Este comportamento demonstrou que o sombreamento a partir de 50%, provavelmente modificou o desenvolvimento do fruto, prolongando o período de maturação. Já em relação à SPS o sombreamento não alterou a sua atividade, sendo os maiores valores encontrados nos estádios verde cana e cereja.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG e ao INCT CAFÉ pelo auxílio financeiro na condução dos experimentos.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro para participação no VII Simpósio de Pesquisa dos Cafês do Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, M.N.; ASCH, F.; WU, Y.; JENSEN, C.R.; NÆSTED, H.; MOGENSEN, V.O. & KOCH, K.E. Soluble invertase expression is an early target of drought stress during the critical, abortion-sensitive phase of young ovary development in maize. **Plant Physiology**, 130: 591-604, 2002.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, n. 1/2, p. 248-254, May, 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Normais Climatológicas** 1961-1990. Brasília, 84 p. 1992.
- COPELAND, L. Enzymes of Sucrose Metabolism. **Methods in Plant Biochemistry**, Academic Press, San Diego 3: 73-83, 1990.
- DALI N, MICHAUD D, YELLE S. Evidence for the involvement of sucrose phosphate synthase in the pathway of sugar accumulation in sucrose-accumulating tomato fruits. **Plant Physiology**. v. 99, p. 434-438, 1992.
- DAMATTA, F.M.; RONCHI, C.P.; MAESTRI, M.; BARROS, R.S. Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.19, p.485-510, 2007.

- ESCHERICH, W. Free space invertase, its possible role in phloem unloading. **Ber. Deut. Bot. Ges.** v. 93, p. 87-113, 1980.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR 4. 3: sistema de análises estatísticas.** Lavras: UFLA, 1999.
- GEROMEL C, FERREIRA LP, GUERREIRO SM, CAVALARI AA, POT D, PEREIRA LF, LEROY T, VIEIRA LG, MAZZAFERA P, MARRACCINI P. Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. **Journal of Experimental Botany** v.57, p. 3243–3258, 2006.
- GOMES, I.A.C.; CASTRO, E. de; SOARES, A.M.; ALVES, J.D.; ALVARENGA, M.I.N.; ALVES, E.; BARBOSA, J.P.R.A.; FRIES, D.D. Alterações morfofisiológicas em folhas de *Coffea arabica* L.cv. ‘Oeiras’ sob influência do sombreamento por *Acaia mangium* Willd. **Ciência Rural**, v.38, n.1, p.109-115, 2008.
- KANTEN, R. V.; VAAST, P. Transpiration of Arabica coffee and associated shade tree species in sub-optimal, low-altitude conditions of Costa Rica. **Agroforestry Systems**, v.67, n.2, p.187-202, 2006.
- KOCH, K.E. & ZENG, Y. Molecular approaches to altered C partitioning: genes for sucrose metabolism. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** v. 127, p. 474-483, 2002.
- LEITE, G. H. P.; CRUSCIOL, C. A. C.; LIMA, G. P. P.; SILVA, M. A. Reguladores vegetais e atividade de invertases em cana-de-açúcar em meio de safra. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 718-725, maio/jun. 2009.
- Lowell, C.A.; Tomlinson, P.T. & Koch, E. Sucrose-metabolizing enzymes in transport tissues and adjacent sink structures in developing citrus fruit. **Plant Physiology**. v. 90, p. 1394-1402, 1989.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v.31, n.3, p. 426-428, Mar. 1959.
- MIRON D, SCHAFFER AA. Sucrose phosphate synthase, sucrose synthase, and invertase activities in developing fruit of *Lycopersicon esculentum* Mill. and the sucrose accumulating *Lycopersicon hirsutum* Humb. and Bonpl. **Plant Physiology**, v. 95, p. 623–627, 1991.
- MORAIS, H.; MARUR, C.J.; CARAMORI, P.H.; RIBEIRO, A.M.A. de; GOMES, J.C. Características fisiológicas e de crescimento de caféiro sombreado com gandu e cultivado a pleno sol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.1131-1137, 2003.
- MUSCHLER, R. Shade improves coffee quality in sub-optimal coffee zone of Costa Rica, **Agroforest System**. v. 51, p. 131-139, 2001.
- QUICK, P. & SCHAFFER, A.A. Sucrose metabolism in sinks and sources. In: ZAMSKI, E.; SCHAFFER, A.A. Editors, **Photoassimilate distribution in plants and crops, source–sink relationships**, Marcel Dekker, New York 115-156, 1996.
- ROBINSON NL, HEWITT JD, BENNETT AB. Sink metabolism in tomato fruit. **Plant Physiology**, v. 87, p. 727–730, 1988.
- ROITSCH, T.; BAIIBREA, M.; HOFMANN, R.; PROESIS, A. & SINHA, A.K. Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. **J. Exp. Bot.** v. 54, p. 513-524, 2003.
- ROITSCH, T.; GONZÁLEZ, M. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. **Trends in Plant Science**, London, v. 9, n. 12, p. 606-613, Dec. 2004.
- STURM, A.; TANG, G. Q. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. **Trends in Plant Science**, London, v. 4, n. 10, p. 401-407, Oct. 1999.
- VAAST, P.; BERTRAND, B.; PERRIOT, J.J.; GUYOT, B. & GÉNARD, M. Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea arabica* L.) under optimal conditions. **J. Sci. Food Agr.** v. 86, p. 197-204, 2006.
- VAN HANDEL, E. Direct microdetermination of sucrose. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 22, 280-283, 1968.
- WANG F, SANZ A, BRENNER ML, SMITH A. Sucrose synthase, starch accumulation, and tomato fruit sink strength. **Plant Physiology**, v. 101, p. 321–327, 1993.
- WENDLER, R.; VEITH, R.; DANCER, J.; STITT, M. & KOMOR, L. Sucrose storage in cell suspension cultures of *Saccharum* sp. (sugarcane) is regulated by a cycle of synthesis and degradation. **Planta**, v. 183, p. 31-39, 1990.
- WINTER, H.; HUBER, S. S. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Boca Raton, v. 35, n. 4. p. 253-289, 2000.
- YELLE, S.R.T.; CHETELAT, R.T.; DORAIS, M.; DEVERNA, J.W. & BENNETT, A.B. Sink metabolism in tomato fruit: IV. Genetic and biochemical analysis of sucrose accumulation. **Plant Physiology**. 95: 1026-1035, 1991.