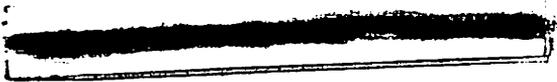




**ATIVIDADE HIDROLÍTICA DA SACAROSE  
ASSOCIADA AO DESENVOLVIMENTO DO  
FRUTO DE CAFEIRO**

**CLARA GEROMEL**

**2002**



CIRCULAÇÃO  
DATA DE

53224

39669MFN

CLARA GEROMEL

**ATIVIDADE HIDROLÍTICA DA SACAROSE  
ASSOCIADA AO DESENVOLVIMENTO DO FRUTO  
DE CAFEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Amauri Alves de Alvarenga

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

2002



**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

**Geromel, Clara**

Atividade hidrolítica da sacarose associada ao desenvolvimento do fruto de  
cafeeiro / Clara Geromel. -- Lavras : UFLA, 2002.

43 p. : il.

**Orientador: Amauri Alves de Alvarenga.**

**Dissertação (Mestrado) – UFLA.**

**Bibliografia.**

1. Café. 2. Invertase. 3. Susy. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-583.52

-633.73

CLARA GEROMEL

**ATIVIDADE HIDROLÍTICA DA SACAROSE ASSOCIADA AO  
DESENVOLVIMENTO DO FRUTO DE CAFEIEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós Graduação em Agronomia, área de concentração Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre".

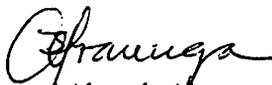
APROVADA em 19 de fevereiro de 2002.

Dr. Antonio Nazareno Guimarães Mendes

UFLA

Dr. Nelson Delú Filho

UFLA



Prof. Dr. Amaury Alves de Alvarenga

UFLA

(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus pais  
Angelo Geromel Filho e Maria Altair Busca Geromel

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

A Universidade Federal de Lavras e ao Setor de Fisiologia Vegetal pela oportunidade de realização desse curso.

Ao CnPq pelo incentivo financeiro e educacional que me foram dados.

Ao professor Amauri Alves de Alvarenga pela orientação e contribuição, na execução do experimento.

Ao professor Nelson Delú Filho pela co-orientação e amizade no decorrer do curso.

Aos professores Antônio Nazareno Guimarães Mendes e Paulo Mazzafera pelas sugestões dadas.

Ao pesquisador Marcelo Murad Magalhães pela amizade, incentivo e ajuda no decorrer do curso.

Ao estudante de iniciação científica Leandro Flavio Carneiro pela grande ajuda e disponibilidade durante a condução do experimento.

Aos funcionários do Setor de Fisiologia, Evaristo, Izonel, Lena, Joel e Odorêncio; pela ajuda e agradável convívio.

Aos amigos do curso, Alessandro, Cláudio, Dárlan, Erivaldo, Gustavo, Juliana, Lílian, Marina, Jorge e Patrícia pela companhia, amizade e ajuda.

Aos amigos, Ana Cristina, Anderson, André, Edgar, Érica, Gabriela e Guilherme, pela companhia e momentos de descontração.

Aos meus grandes amigos Ilka e Rupert, pela imensa ajuda e incentivo.

Ao Daniel pelo carinho e paciência.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>RESUMO</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	04
2.1 O cafeeiro e sua importância econômica.....	04
2.2 Relação fonte-dreno.....	05
2.3 Produtividade vegetal e particionamento de carbono.....	07
2.4 Enzimas envolvidas no metabolismo do carbono.....	08
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	12
3.1 Material vegetal.....	12
3.2 Extração para atividade invertásica, sacarose, açúcares redutores e açúcares solúveis totais.....	13
3.3 Extração para amido e atividade da sintase da sacarose.....	14
3.4 Quantificação de açúcares redutores.....	14
3.5 Quantificação de açúcares solúveis totais.....	14
3.6 Quantificação de amido.....	15
3.7 Quantificação de sacarose.....	15
3.8 Meio de reação e quantificação das invertases.....	15
3.9 Meio de reação e quantificação da sintase da sacarose.....	15
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	17
4.1 Acúmulo de biomassa fresca e seca durante o desenvolvimento do fruto de café.....	17
4.2 Conteúdo de carboidratos solúveis totais, redutores e amido.....	20
4.3 Atividade invertásica em frutos de café.....	25
4.4 Atividade da sintase da sacarose.....	31
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	35
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	36

## RESUMO

GEROMEL, C. **Atividade hidrolítica da sacarose associada ao desenvolvimento do fruto de cafeeiro.** Lavras: UFLA, 2002. 43 p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia – Área de concentração Fisiologia Vegetal)\*

Sabendo-se que a produtividade de uma cultura está na dependência direta de três fatores básicos de produção: climáticos, genéticos e fisiológicos, foram abordados nesse estudo, alguns aspectos fisiológicos do metabolismo de carboidratos, envolvidos no processo de enchimento de frutos de cafeeiro em diferentes estádios de seu desenvolvimento. A relação fonte-dreno foi um dos aspectos abordados, com o objetivo de estudar a assimilação e o particionamento de carbono nos frutos, bem como, o tipo de transporte e as enzimas envolvidas na hidrólise da sacarose. Foram avaliados nesses frutos a porcentagem de biomassa seca, acúmulo de biomassa fresca e seca, carboidratos solúveis, redutores, amido e atividades das enzimas hidrolíticas sintase da sacarose e as três isoformas da invertase (neutra do citosol, ácida do vacúolo e ácida da parede celular). Durante o desenvolvimento do fruto de café, foi possível observar que o descarregamento preferencial do floema ocorreu pela rota simplástica, mediada pela sintase da sacarose, desde o primeiro estádio (chumbinho) até o último estádio avaliado (cereja). Essa enzima está envolvida, também, na regulação da biossíntese de amido, fornecendo substrato a partir da hidrólise da sacarose importada pelo fruto. A enzima sintase da sacarose, ao contrário da invertase, é um fator limitante na assimilação de sacarose pelo fruto.

---

\* Comitê orientador: Prof. Dr. Amauri Alves de Alvarenga - UFLA (orientador), Prof. Dr. Nelson Delú Filho – UFLA (Co-orientador).

## ABSTRAT

**GEROMEL, C. Hydrolytic activity of the sucrose associated to the development of the coffee fruit.** Lavras: UFLA, 2002. 43 p. (Dissertation-masters in Agronomy/Plant Physiology)\*

Productivity of a plant crop depends three basic factors (climatic, genetic and physiological), and this paper aimed to study some physiological aspects of the of carbohydrate metabolism involved in filling process of coffee fruits development. The relation source-sink was one of the evaluated aspects, with the objective to study the assimilation and the breaking of carbon in the fruits, as well as, the type of carrier and enzymes involved sucrose hydrolysis. The percentage of dry biomass, accumulation of fresh and dry biomass, soluble and reducing carbohydrates, starch and activities of hydrolytic enzymes sucrose synthase and isoenzymes of invertase (neutral, and acid ). During the fruit development it was possible to observe that the foreground unloading of the phloem occurred by simplastic pathway, mediated by sucrose synthase , since the first stage (pinhead stage) until the last evaluated stage (berry). This enzyme is also involved in the regulation of starch biosynthesis, supplying substract from hydrolysis of sucrose imported by the fruit. The enzyme sucrose synthase, in contrast of invertase, limits the assimilation of sucrose by the fruit.

---

\* Guidance Committee: Dr. Amauri Alves de Alvarenga - UFLA (Major Professor), Prof. Dr. Nelson Delú Filho - UFLA .

## 1 INTRODUÇÃO

Pelo papel estratégico que a cultura cafeeira desempenha na economia brasileira, sendo uma das principais culturas agrônômicas, estudos vêm sendo desenvolvidos com o propósito de aumentar a sua produtividade, procurando dessa forma, melhorar o rendimento econômico da lavoura.

A produtividade da cultura é o resultado da interação dos diversos fatores relacionados ao manejo da cultura, do solo, do clima e da própria planta.

Com a necessidade de se obter uma produção final satisfatória, caracterizada pelo número e peso de grãos, resultante de fatores genéticos e fisiológicos, eventos como a divisão (fator genético) e expansão celular (fator fisiológico) parecem ser pontos passíveis de manipulação, desde que o controle da regulação metabólica desses eventos seja estudado e compreendido.

Quanto à expansão celular, esta pode ser manipulada através da relação fonte-dreno, mais especificamente, pela força do dreno. Plantas com maior força de dreno são capazes de atingir maior produtividade, em condições semelhantes às plantas com menor força de dreno, pois o carbono assimilado entre os drenos determina, principalmente, a taxa e modelo do crescimento da planta (Ho, 1996). A força da fonte refere-se à taxa a qual os assimilados são produzidos. A elevada força da fonte pode aumentar fortemente o crescimento total da planta, mas informações no efeito da força da fonte no particionamento dentro de órgãos da planta é limitado (Marcelis, 1996).

Plantas que possuem frutos de maior tamanho, com maior força de dreno, possuem menor número de frutos por planta que outras, que produzem frutos de tamanho menor (Ho, 1996), embora, geralmente, a taxa de expansão do fruto seja proporcional ao fornecimento de assimilado da fonte para o dreno (Ehret & Ho, 1986).

Para a cultura do café, apesar de nem sempre haver uma correlação direta, entre tamanho do fruto e produtividade da planta, aumentar o tamanho do fruto parece ser uma alternativa vantajosa e, economicamente interessante para o produtor, quanto à classificação do café relacionada ao tamanho da peneira

A sacarose é o principal fotoassimilado transportado pelas plantas superiores, sua participação nos processos metabólicos, nos tecidos dreno, necessita da sua degradação em hexoses, uma vez que esses açúcares são o ponto de partida para as diferentes rotas metabólicas existentes nos tecidos dreno (Sung et al., 1988, Sung et al., 1990).

A hidrólise da sacarose em tecidos dreno pode ocorrer via invertase e/ou sintase da sacarose. O comportamento diferencial dessas enzimas, associadas ao desenvolvimento do fruto, torna possível uma melhor compreensão do processo de descarregamento do floema, sendo que para o café, informações dessa natureza não são encontradas na literatura.

O descarregamento do floema pode ocorrer por meio de duas rotas distintas, ou seja, simplástica ou apoplástica. Quando o descarregamento ocorre pela primeira rota citada, a sacarose é transportada de uma célula à outra através dos plasmodesmos, até chegar ao interior do tecido dreno, quando o descarregamento ocorre pela rota apoplástica, a sacarose é transportada através do apoplasto, com o auxílio de proteínas carreadoras ou transportadoras, facilitando esse tipo de transporte.

Em uma das rotas, a apoplástica, a hidrólise da sacarose pode ser mediada pela ação de uma invertase ácida ligada covalentemente à parede celular, no apoplasto e, descarregada no interior da célula do tecido dreno, na forma de hexose, ou a sacarose pode ser descarregada na sua forma íntegra nas células do tecido dreno e ser hidrolisada pelas enzimas sintase da sacarose e/ou invertase neutra do citosol. Quando o descarregamento ocorre pelo simplasto, a

hidrólise da sacarose pode ocorrer, como citado anteriormente, pela sintase da sacarose e/ou invertase neutra no citosol.

Não havendo nenhum trabalho nessa área com a cultura do cafeeiro, o objetivo desse trabalho foi verificar as participações das diferentes isoenzimas invertásicas e da sintase da sacarose, relacionadas ao acúmulo de biomassa seca, fresca, no conteúdo de carboidratos solúveis, redutores e amido durante o desenvolvimento do fruto de café.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 O cafeeiro e sua importância econômica

Segundo Silva & Leite (2000), a América do Sul é a região do mundo que concentra a maior produção de café, sendo que o Brasil e a Colômbia sozinhos, produziram em torno de 40% do total mundial nas últimas duas décadas.

Apesar de apresentar taxas decrescentes na produção e na participação do mercado internacional, nos anos recentes, o Brasil continua como principal produtor e exportador mundial de café arábica, sendo responsável por 25% da produção e 17% da exportação mundial, também o segundo maior consumidor de café (Anuário..., 2001).

Existem descritas cerca de cem espécies de café, das quais apenas duas, *Coffea arabica* e *Coffea canephora*, assumem importância econômica no mercado internacional (Fazuoli, 1986) e seu produto é comercializado com a denominação genérica de "café arábica" e "café robusta" respectivamente. Cerca de 70% do café comercializado no mundo é do tipo "arábica" e os 30% restantes do tipo "robusta".

A espécie *Coffea arabica* é cultivada em todas as regiões cafeeiras do estado de Minas Gerais, com predominância das cultivares Catuaí e Mundo Novo.

O estado de Minas Gerais, há alguns anos, tem se destacado como o maior produtor brasileiro de café, mantendo uma média em torno de 50% de toda a produção nacional. A região sul de Minas, por sua vez, produz metade do café do estado, sendo que praticamente 100% de sua produção é formada pela espécie *Coffea arabica* (Mendes & Guimarães, 1997 e Ribeiro et al., 1998).

A cafeicultura brasileira é considerada de baixa produtividade, com média entre 10-12 sacas beneficiadas por hectare (Mendes & Guimarães, 1997).

A produção da cultura do cafeeiro é o resultado integrado dos diversos fatores relacionados ao manejo da cultura, do solo, clima e da própria planta.

## **2.2 Relação fonte-dreno**

Uma das características fundamentais das plantas é a capacidade de reduzir gás carbônico na presença de luz solar e fixar na forma de carboidratos, em tecidos fotossinteticamente ativos (tecidos fonte) e, posterior distribuição para tecidos não fotossintéticos (tecidos dreno).

De acordo com sua capacidade para exportar assimilados ou na sua dependência em importá-los, os órgãos vegetais podem ser classificados em tecidos fonte e dreno respectivamente.

A sacarose é o principal carboidrato importado por muitos tecidos dreno de plantas. Ela é sintetizada em tecidos fonte e exportada via floema, a longas distâncias para os tecidos dreno. Ela não apenas funciona como um metabólito de transporte, mas também contribui para o fluxo de massa entre os órgãos envolvidos (Lalonde et al., 1999).

A taxa de translocação de assimilado no floema é dirigida por um gradiente decrescente, na concentração de soluto, água, ou potencial de turgescência entre a fonte e o dreno (Ho, 1979; Wolswinkel, 1985; Lang & Thorpe, 1986; Patrick, 1988; Lang & Daring, 1991). A utilização e compartimentação dos assimilados no dreno são importantes para manter esses gradientes (Marcelis, 1996), pois à medida que ocorre a hidrólise dos assimilados importados, a concentração de soluto diminui, favorecendo o transporte. Esse comportamento obedece ao modelo baseado no fluxo de massa, de acordo com a hipótese de Munch (Minchin et al., 1993).

A rota física completa do transporte de sacarose do tecido fonte para dreno, ainda não está completamente elucidada, em relação a muitas espécies. Baseado no transporte de sacarose radioativa marcada e na composição da seiva

apoplástica de frutos de tomate, a sacarose pode ser descarregada simplasticamente e/ou apoplasticamente (Damon et al., 1988). Foi observado em frutos de toamte, quando a sacarose é descarregada simplasticamente, pode ser principalmente hidrolisada pela sintase da sacarose no citosol (Robinson et al., 1988) e, quando a sacarose é descarregada apoplasticamente pode ser hidrolisada, principalmente, pela invertase ácida da parede celular, visto que a hexose é a principal forma de açúcar na seiva apoplástica (Damon et al, 1988).

Tem sido sugerido que o transporte simplástico pode ser suficiente para justificar a importação de assimilado pelo fruto, no estágio inicial do desenvolvimento, enquanto o transporte apoplástico pode ser a principal rota de transporte de açúcar em frutos mais desenvolvidos (Johson et al., 1988; Offler & Holder, 1992).

Os tecidos dreno podem empregar os assimilados para o seu crescimento e desenvolvimento (meristemas) ou para armazenamento (semente e tubérculos, por exemplo), nos quais os assimilados importados são depositados nas células na forma de amido, ácido graxo e proteínas (tubérculos e sementes), sendo a semente de café acumuladora de ácido graxo.

O particionamento de matéria seca é o resultado final do fluxo de assimilado de órgãos fonte para órgãos dreno. O particionamento de matéria seca entre os drenos de uma mesma planta é regulado pelos próprios drenos (Ho, 1988; Verkley & Challa, 1988), sendo que o fornecimento de assimilado afeta apenas o grau de competição entre os drenos e a força da fonte parece não ter nenhum efeito direto no particionamento de matéria seca. Porém, num longo período, o particionamento de matéria seca pode mudar, devido à mudança no número de drenos (Marcelis, 1996).

### 2.3 Produtividade vegetal e particionamento de carbono

Com relação a grande competitividade e à necessidade de se obter maior produtividade de grãos e vigor vegetativo, o desenvolvimento de cultivares com essas características tem sido o principal objetivo de todo programa de melhoramento vegetal. Procurando cultivares com produtividades cada vez maiores, além das técnicas básicas, geralmente usadas como espaçamento, tolerância a estresses bióticos e abióticos e outras manipulações fitotécnicas, que nem sempre apresentam resultados satisfatórios, uma possibilidade viável, para se obter cultivares de café com alta produtividade, é o estudo na relação fonte-dreno.

O tamanho potencial do fruto, como o número de células e disposição na planta, é determinado, principalmente, por fatores genéticos, e o tamanho do fruto é determinado por fatores ambientais e fisiológicos, que envolvem a expansão das células.

Geralmente, a taxa de expansão do fruto é proporcional ao fornecimento de assimilados (Ehret & Ho, 1986). Por exemplo, o acúmulo de açúcares em células de armazenamento do fruto de tomate é crucial para seu tamanho e sabor (Ho, 1996), visto que, aproximadamente, metade da matéria seca é hexose (Ho, 1988).

Ho (1996) observou que o transporte e o metabolismo da sacarose podem afetar o acúmulo de biomassa seca e a qualidade no fruto de tomate. Plantas de tomate com diferentes hábitos de crescimento e frutificação acumulam quantidades semelhantes de matéria seca por planta, porém o particionamento de biomassa seca é afetado. O mesmo autor, estudando diferentes cultivares de tomate, observou que cultivares que apresentavam maior número de frutos por planta, possuíam frutos de tamanhos menores, enquanto cultivares que apresentavam menor número de frutos, possuíam frutos de tamanho maior. O pequeno tamanho do fruto pode ser a principal causa do baixo

particionamento do fruto e aumentar o tamanho do fruto parece ser o caminho mais eficiente para aumentar a produção de tomate.

A força da fonte de forma isolada parece não ter efeito direto no particionamento de carbono (Marcelis, 1996). Foi relatado por Marcelis (1993), em plantas de pepino um efeito indireto dessa força, por um aumento no número de frutos na planta, ao invés do efeito direto no particionamento de matéria seca. Porém, num longo período (semanas), o particionamento de carbono pode mudar devido a mudanças no número de drenos (Marcelis, 1996). Mas esse mecanismo foi interpretado por Farrar (1992) por desempenhar um controle grosseiro no particionamento de carbono.

#### **2.4 Enzimas envolvidas no metabolismo do carbono em tecidos-dreno**

A sacarose desempenha papel principal no crescimento e desenvolvimento de plantas superiores. Disponibilidade de metabólitos para a síntese de sacarose e demanda por produtos de sua degradação são fatores importantes a vários processos metabólicos, sendo que algumas enzimas estão envolvidas no metabolismo da sacarose, enzimas biossintéticas e degradativas.

Considerando que a sacarose não é um substrato direto para a maioria dos processos envolvidos no crescimento, desenvolvimento e armazenamento nos drenos, conversões de sacarose para hexoses são freqüentemente o ponto de partida para o metabolismo do dreno (Sung et al., 1988, Sung Sung et al., 1990). Durante o desenvolvimento dos frutos, esses acumulam carboidratos na forma de amido, sacarose e hexose (Hubbard et al., 1991).

A biossíntese da sacarose é catalisada pelas enzimas: sintase da sacarose fosfato (SPS), que é uma enzima característica de folha e fosfatase da sacarose fosfato (SPPase), desempenhando importante função no metabolismo da sacarose em frutos de muitas espécies (Hubbard et al., 1991).

Em frutos de tomate, Miron & Schaffer (1991) mostraram que o aumento da atividade da SPS está associado com o acúmulo de açúcares durante o amadurecimento. Hubbard et al. (1991), também observaram aumento da atividade da SPS em frutos de pêssego, morango, manga e kiwi durante o período de acúmulo de açúcares.

A degradação da sacarose pode ser catalisada por duas diferentes classes de enzimas. As invertases catalisam a hidrólise irreversível da sacarose em glicose e frutose. Em contraste, uma clivagem reversível da sacarose é catalisada pela sintase da sacarose em UDPglicose e frutose (Winter & Huber, 2000).

Sung et al. (1988), sugerem que esses dois caminhos para a degradação da sacarose tenham funções diferentes durante o desenvolvimento da planta e são modulados como resposta a mudanças ambientais. A atuação de cada enzima é dependente de diferentes processos biossintéticos e de armazenamento. Dochelert (1990) verificou que diferentes partes do núcleo de milho em desenvolvimento diferem na composição de enzimas e no acúmulo de produtos de armazenamento. A rota presente de conversão de sacarose pode depender de processos que ocorrem no dreno naquele momento. (Hubbard et al., 1991) sugerem que a sacarose para ser utilizada na biossíntese de óleo seja degradada pela invertase e quando utilizada para bióssíntese de amido é metabolizada pela sintase da sacarose. Por exemplo, em núcleos de milho em desenvolvimento, a invertase no embrião é responsável pelo fornecimento de carbono à síntese de óleo (Doehrlert, 1990), enquanto a sintase da sacarose fornece carbono para síntese de amido (Déjardin et al., 1997) e da parede celular (Chourey et al., 1998; Nakai et al., 1999).

A sintase da sacarose é uma enzima da qual são conhecidas duas isoformas: uma livre no citosol e outra associada à plasmalema (Barrat et al., 2001) e sua principal função parece ser a de clivar a sacarose para síntese de amido (Déjardin et al., 1997) e da parede celular (Chourey et al., 1998; Nakai et

al., 1999) pelo simples fato de que um dos produtos de sua hidrólise, é UDPG, precursor para síntese desses dois compostos. Em endosperma de cereal e tubérculos de batata, hexoses resultantes da hidrólise da sacarose, pela sintase da sacarose, fornecem substrato para a síntese de amido nesses órgãos de armazenamento (Chourey & Nelson 1976; Claussen et al., 1985; Dale & Housley 1986; Sung et al., 1989a ; Sun et al., 1992; Wang et al., 1994) e substrato para síntese de celulose e calose (Winter & Huber, 2000). A forma citosólica pode fornecer produtos para o metabolismo geral, enquanto a forma associada à plasmalema pode fornecer UDPG, diretamente para a síntese de celulose (Amor et al., 1995). Entretanto, o mecanismo que separa a atividade diferencial da sintase da sacarose entre o citosol e a plasmalema é desconhecido (Barrat et al., 2001).

Em muitos tecidos dreno de crescimento e armazenamento ativo, a atividade da sintase da sacarose é bastante alta (Ross & Daves, 1992) e foi proposto por Sun et al. (1992) e Sung et al. (1989b), que a atividade da sintase da sacarose pode servir como um indicador bioquímico de crescimento ativo do dreno. Esta sugestão é válida, pois a atividade da sintase da sacarose é geralmente baixa, em tecidos fonte fotossintéticos e alto, em tecidos dreno de crescimento (ap Ress, 1984).

Durante o desenvolvimento de tubérculos de batata (Pressey, 1969) observou-se que a atividade da sintase da sacarose é alta, em tubérculos em crescimento, mas diminui, durante e após a colheita e concluiu-se que esta enzima está associada ao desenvolvimento de tubérculos de batata.

Três isoformas de invertases são conhecidas: as invertases ácidas solúveis localizadas no vacúolo, invertase ácida insolúvel extracelular associada à parede celular e as neutras ou alcalinas localizadas no citosol de células vegetais (Quick, 1996).

Acredita-se que a invertase ácida da parede celular desempenha importante papel na assimilação de sacarose fora dos tecidos dreno, no apoplasto, estabelecendo um gradiente de concentração de sacarose da fonte para o dreno (Escherich, 1980).

A invertase neutra ou alcalina é considerada enzima de "manutenção" envolvida na degradação da sacarose, quando a atividade da invertase ácida e sintase da sacarose são baixas (Winter & Huber, 2000), normalmente em tecidos cuja taxa metabólica é inferior, quando comparado à tecidos meristemáticos, por exemplo.

Sung et al. (1994) verificaram que durante o início do desenvolvimento da vagem de feijão (9DPA), a atividade da invertase ácida está associada à conversão de sacarose importada para o alongamento e acúmulo de materiais de reserva e estrutural que diminui gradualmente com o acúmulo de peso seco, tornando a sintase da sacarose a enzima predominante. O mesmo foi observado durante o desenvolvimento de folhas de feijão, a atividade da invertase ácida aumenta durante a fase de expansão rápida e diminui, quando as folhas alcançam seu tamanho final (Morris & Arthur, 1994; Pate et al., 1985). E, ao contrário, em sementes de feijão em crescimento, acumulando biomassa seca, a atividade da invertase ácida não foi predominante, pois a semente estava acumulando amido e a sintase da sacarose foi a enzima predominante.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

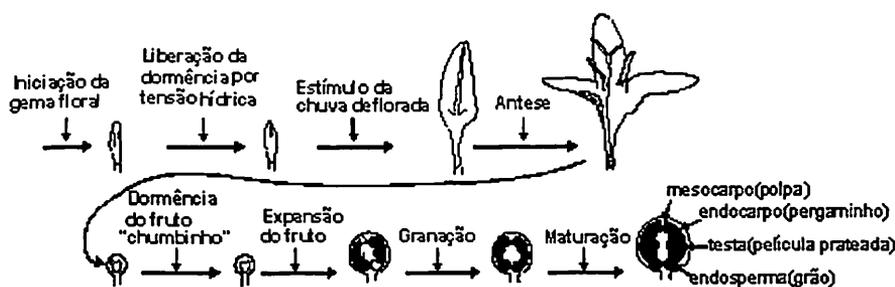
### 3.1 Material vegetal

Foram utilizados frutos de cafeeiro da cultivar Catuaí Vermelho IAC 99, com aproximadamente 5 anos, cultivados em latossolo vermelho amarelo (Lva), localizado no município de Lavras. Os frutos foram coletados em cinco diferentes estádios de desenvolvimento denominados chumbinho, verde, verde granado, cana e cereja (Figura 1). Após a coleta, os frutos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a  $-86^{\circ}\text{C}$  até o uso. No estágio chumbinho os frutos foram separados em pericarpo (endocarpo + mesocarpo + exocarpo) e semente (película prateada + perisperma + embrião) e nos demais estádios, os frutos foram divididos em (mesocarpo + exocarpo) e semente (película prateada, endosperma e embrião) no momento da utilização. Nesses estádios, o pergaminho já desenvolvido (endocarpo) era retirado da semente e descartado.

Nas figuras, os termos casca e semente identificam as partes nas quais os frutos foram divididos.

O delineamento usado foi o inteiramente casualizado (DIC), exceto para conteúdo de biomassa fresca e seca e porcentagem de biomassa seca, quando utilizadas as médias de 10 repetições (10 frutos por estágio); para as demais análises foram utilizadas 3 repetições por estágio. O teste de média utilizado foi o de Tukey a 5%.

A obtenção de biomassa fresca foi obtida pela média da pesagem de 10 frutos por estágio e o mesmo processo foi utilizado para biomassa seca, após material vegetal fresco ser mantido em estufa por 72 horas a  $60^{\circ}\text{C}$ .



**FIGURA 1:** Esquema dos estádios de floração e da frutificação do cafeeiro (Adaptado de Cannell, 1983).

### 3.2 Extração para quantificação de açúcares solúveis totais, redutores sacarose, e determinação da atividade invertásica

Foi moído, em nitrogênio líquido, 1g de material vegetal, seguido da adição de 4 mL de tampão fosfato a 0,1 mol/L pH 7,0, acrescido com 2% (p/v) de ácido ascórbico (Mazzafera & Robinson, 2000). Após a homogeneização, o extrato foi centrifugado a 20.000g, durante 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante coletado foi dividido em duas partes, em uma delas foi adicionado 40% (v/v) de glicerol e armazenada a -86°C, para posteriores ensaios enzimáticos e a outra apenas armazenada a -86°C, para posteriores análises de açúcares solúveis totais, redutores e sacarose. O precipitado resultante da centrifugação anterior foi ressuspenso em 4 mL de tampão citrato + NaCl 0,2 mol/L pH 5,0 e mantido a 4°C, por 24 h, sendo, em seguida, centrifugado a 20.000g, durante 20 minutos a 4°C. No sobrenadante coletado foram adicionados 40% (v/v) de glicerol e armazenado a -86°C, para posteriores ensaios enzimáticos da invertase ácida da parede celular (Lowell et al., 1989).

### **3.3 Extração para determinação da atividade da sintase da sacarose e quantificação de amido**

Foi moído em nitrogênio líquido, 1g de material vegetal, seguido da adição de 4 mL de tampão de extração HEPES – NaOH 50 mmol/L pH 7,0, 2mmol/L de MgCl<sub>2</sub>, 2mmol/L de DTT e 1mmol/L de EDTA (Déjardim et al., 1997), acrescido com 2% (p/v) de ácido ascórbico (Mazzafera & Robinson, 2000). Após homogeneização, o extrato foi centrifugado a 20.000g, por 20 minutos, a 4<sup>o</sup>C e, no sobrenadante coletado foi adicionado 40% (v/v) de glicerol e armazenado a -86<sup>o</sup>C para posterior ensaios enzimáticos. O precipitado resultante da centrifugação anterior foi lavado 3 vezes com tampão fosfato a 0,1 mol/L pH 7,0, acrescido com 2% (p/v) de ácido ascórbico e centrifugado a 20.000g, durante 10 minutos a 4<sup>o</sup>C. Após 10 minutos em banho de gelo, o precipitado foi ressuspenso em 10 mL de ácido perclórico 32% (v/v) centrifugado a 20.000g, durante 20 minutos a 4<sup>o</sup>C. Este passo foi repetido mais uma vez e os dois sobrenadantes foram unidos e diluídos para um volume final de 125 mL com água destilada e armazenados a -86<sup>o</sup>C para posterior quantificação de amido.

### **3.4 Quantificação de açúcares redutores**

Os açúcares redutores foram quantificados pelo método de Miller (1959).

### **3.5 Quantificação de açúcares solúveis totais**

Os açúcares solúveis totais foram quantificados pelo método de Yemm & Coccking (1954).

### **3.6 Quantificação de amido**

O amido foi quantificado pela determinação dos açúcares redutores pelo método de Miller (1959) e multiplicados por um fator de correção de 0.9.

### **3.7 Quantificação de sacarose**

Foram utilizados 800  $\mu\text{L}$  do extrato e 800  $\mu\text{L}$  de KOH 30% (p/v) e levados ao banho-maria a 37°C, por 15 minutos (VanHandel, 1968). A sacarose foi quantificada pela determinação de açúcares solúveis totais pelo método de Yemm & Cocking (1954).

### **3.8 Meio de reação e quantificação das invertases**

Para o ensaio da invertase neutra foram utilizados 50  $\mu\text{L}$  do extrato, 950  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,0, contendo 210 mmol/L de sacarose. As amostras foram incubadas por 1 hora a 37°C. A reação foi paralisada pela transferência dos microtubos para nitrogênio líquido e estes foram mantidos a -86°C até o momento da utilização. Para os ensaios das invertases ácidas (solúvel e da parede celular) foram usadas as mesmas condições anteriores, exceto o tampão, substituído por citrato 0,1 mol/L pH 4,5. As atividades das invertases foram determinadas pela dosagem dos açúcares redutores (Miller, 1959).

### **3.9 Meio de reação e quantificação da sintase da sacarose**

A atividade da enzima foi avaliada no sentido de degradação da sacarose e a reação catalisada pela sintase da sacarose consistia de 64  $\mu\text{moles}$  de tampão MES pH 6,0, 125  $\mu\text{mol}$  de sacarose, 0,5  $\mu\text{mol}$  de uridina difosfato (UDP), 403  $\mu\text{L}$  do tampão de extração e 200  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático, num volume total de 1000  $\mu\text{L}$ . A reação foi iniciada com adição do extrato protéico. Os microtubos foram transferidos para o banho-maria a 37°C, por 1 hora e a reação foi paralisada pela transferência dos microtubos para nitrogênio líquido e estes

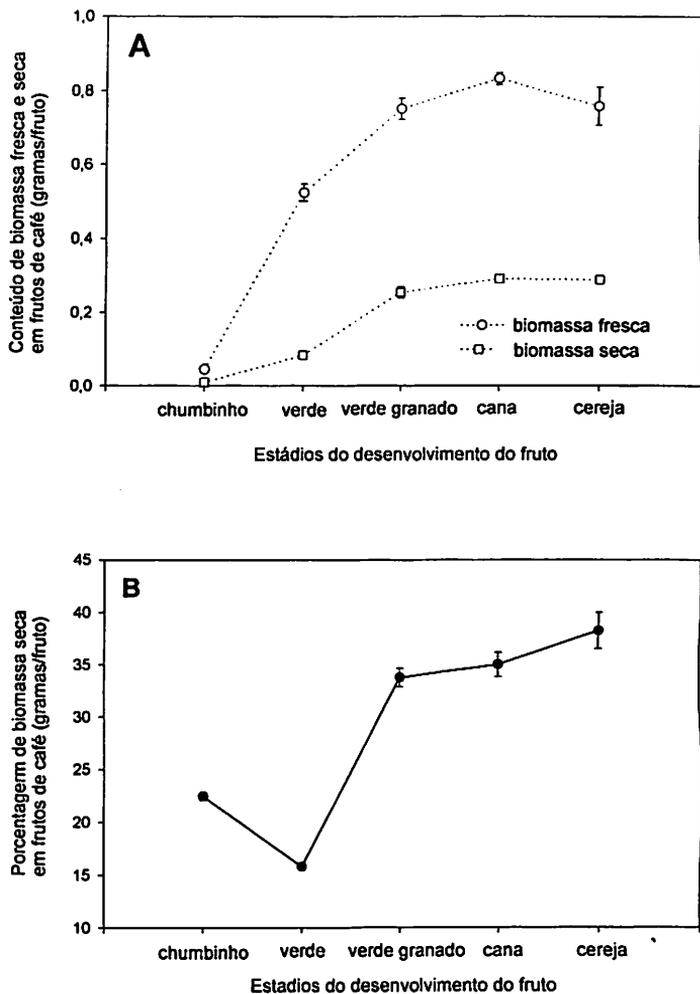
foram mantidos a  $-86^{\circ}\text{C}$ , até o momento da utilização para dosagem dos açúcares redutores (Miller, 1959).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Acúmulo de biomassa fresca e seca durante o desenvolvimento do fruto de café

Na Figura 2 são apresentados os resultados do acúmulo de biomassa seca e fresca (2A) e porcentagem de matéria seca (2B) em frutos de café em diferentes estádios de desenvolvimento.

O crescimento do fruto de café é dividido em cinco fases: (1) período sem crescimento visível; (2) fase de expansão rápida, ao fim do qual o endocarpo endurece; (3) formação do endosperma, que ocorre durante o final da fase de expansão (endosperma leitoso); (4) endurecimento do endosperma que continua até antes da maturação (granação), (5) maturação do fruto (Rena & Maestri, 1985).



**FIGURA 2:** Conteúdo de biomassa fresca e seca (A) e porcentagem de biomassa seca (B), em frutos de café, em diferentes estádios do desenvolvimento (UFLA, 2002). (Média de 10 repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%).

Os frutos de café tiveram um rápido aumento de biomassa fresca, entre as fases chumbinho e verde, quando ocorre o endurecimento do endocarpo (pergaminho).

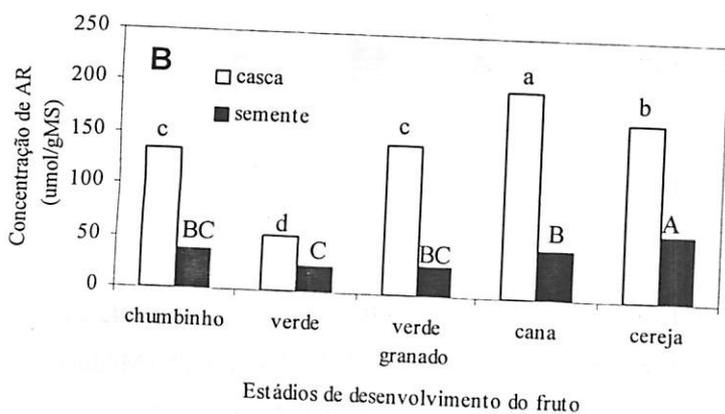
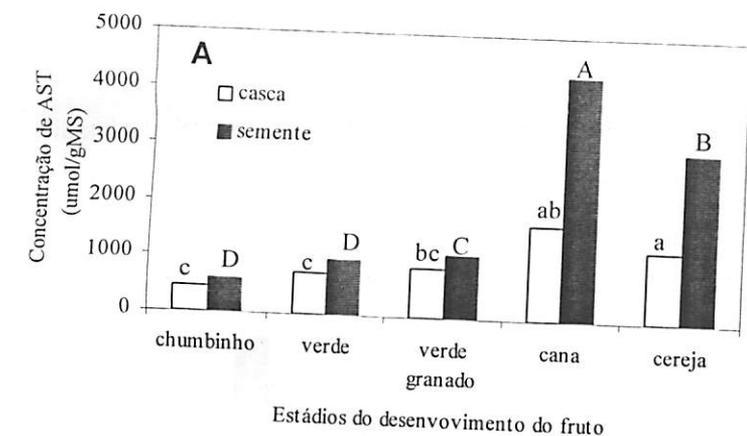
A biomassa fresca do fruto aumentou até o estágio cana e a partir daí houve uma tendência a perder peso fresco (Figura 2A), embora não tenha havido diferenças significativas para as 3 últimas fases do desenvolvimento dos frutos estudados. Entretanto, com relação à porcentagem de biomassa seca acumulada em frutos de cafeeiro (Figura 2B), houve uma redução significativa entre os estádios chumbinho e verde, pois nesse período, o fruto tende a acumular maior teor de água requerido pelos processos metabólicos que estão ocorrendo, como por exemplo, o rápido crescimento por meio da expansão das células, tornando a concentração de solutos, como os açúcares, mais diluída. Do estágio verde até o verde granado foi observado um aumento significativo, pois é nesta fase que está sendo formado o endosperma, seguido de uma tendência à estabilização nos estádios subsequentes do desenvolvimento do fruto. Isso se deve ao fato do fruto já estar no final da fase de expansão, mas ainda pode resultar em aumento do tamanho do fruto e pode ser afetada pelo fornecimento de assimilados da fonte para o dreno, temperatura e, principalmente, teor de água na planta (Ho, 1996). Além disso, a taxa de acúmulo de biomassa seca pode ser usada como uma medida da força do dreno (Ho et al, 1979). Nesta fase, tem início o processo de acúmulo de substâncias no endosperma dos frutos, o que contribui para o aumento de biomassa seca, como observado na Figura 2B. Na próxima fase do desenvolvimento do fruto, a de maturação, este atingirá seu máximo tamanho, sendo esta fase caracterizada pela desidratação do fruto (Figura 2B), embora não tenha havido diferenças significativas nos últimos estádios.

#### 4.2 Concentração de carboidratos solúveis totais, redutores e amido

Na Figura 3 são apresentados os resultados das concentrações de açúcares (AST) (3A) e açúcares redutores (AR) (3B), na casca e semente de frutos de café, nos diferentes estádios do desenvolvimento. As concentrações de AST na casca e na semente de frutos de café apresentaram um padrão de acúmulo semelhante, sendo os maiores valores, encontrados nos dois últimos estádios (cana e cereja). No caso específico dos AST, os maiores teores foram encontrados nas sementes, quando comparados à casca, exceto para o estágio chumbinho, que apresentou comportamento oposto. Quanto aos AR, a concentração na casca e na semente não apresentaram um padrão de acúmulo semelhante. Os maiores acúmulos foram na casca nos estádios cana e cereja.

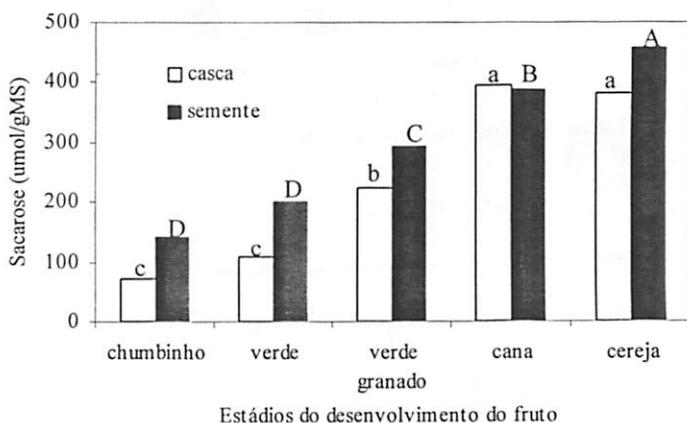
Ho et al. (1987) obtiveram resultados semelhantes, quando estudaram o acúmulo de açúcares, em células de armazenamento, em frutos de tomates e verificaram que esse acúmulo é crucial para seu tamanho final, pois em tomates maduros, por exemplo, 65% da matéria seca são hexoses (principalmente, glicose e frutose) acumuladas no vacúolo dessas células.

Está claro que os açúcares solúveis não apenas são utilizados como uma fonte de carboidratos, no metabolismo anabólico ou catabólico, mas também atuam como moléculas sinalizadoras. Muitos aspectos do crescimento e desenvolvimento da planta parecem estarem submetidos à regulação metabólica pelos açúcares (Weber & Roitsch, 2000).



**FIGURA 3:** Concentração de açúcares solúveis totais (A) e açúcares redutores (B), na casca e na semente de frutos de café em diferentes estádios do desenvolvimento (UFLA, 2002). (Média de 3 repetições. Letras minúsculas comparam valores obtidos para a casca e letras maiúsculas comparam valores obtidos para a semente. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%).

Tanto na casca quanto na semente de café, o padrão de acúmulo de sacarose apresentou um modelo semelhante para os dois tecidos (Figura 4), sendo esse padrão iniciado com valores próximos a 100  $\mu\text{mol/g MS}$ , no estágio chumbinho, atingindo o máximo nos estádios cana, na casca e cereja, na semente.



**FIGURA 4:** Concentração de sacarose na casca e na semente de frutos de café, em diferentes estádios do desenvolvimento (UFLA, 2002). (Média de 3 repetições. Letras minúsculas comparam valores obtidos para a casca e letras maiúsculas comparam valores obtidos para a semente. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%)

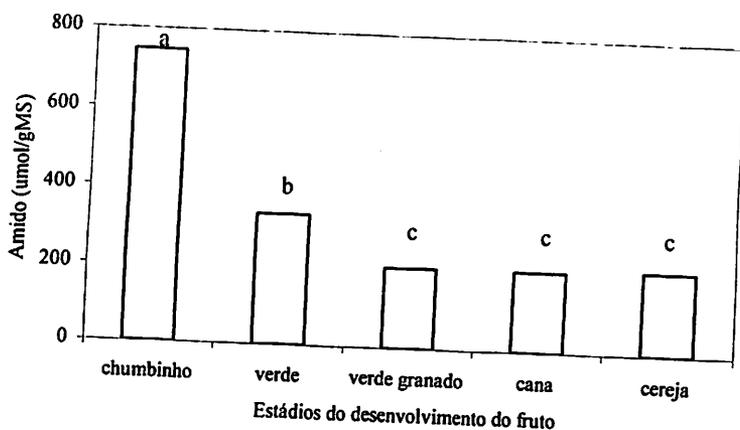
As maiores taxas de incremento no conteúdo de sacarose, no fruto de café (casca e semente), foram observados entre os estádios verde e verde granado e verde granado e cana, o que corresponde, também, ao período de maior acúmulo de biomassa seca (Figura 2B). Na semente, foi observado um aumento no conteúdo de sacarose do estágio chumbinho até o cereja, porém com taxas inferiores às observadas anteriormente. Resultados semelhantes foram

encontrados por Sung et al. (1994), em vagens de feijão, onde o conteúdo de sacarose era baixo nos locais de divisão celular, enquanto que Weschke et al. (2000) relacionaram altos níveis de sacarose, como sendo o gatilho para a rota de armazenamento.

Para a casca, no estágio cereja, o conteúdo de sacarose permaneceu praticamente inalterado em relação ao estágio de maturação anterior.

Hajirezaei et al (2000) relataram que a sacarose está completamente disponível, no espaço apoplástico, no desenvolvimento de tubérculos de batata. Entretanto, a hidrólise da sacarose no apoplasto não afeta a glicólise e não conduz ao acúmulo de hexose-fosfato.

Em contraste ao observado para a concentração de sacarose, o teor de amido em frutos de café, em diferentes estágios de desenvolvimento (Figura 5) apresentou um comportamento inverso, iniciando com altos níveis no estágio chumbinho e reduzindo, gradualmente, até o estágio verde granado, sendo que, a partir desse estágio, os teores observados permaneceram estatisticamente inalterados.



**FIGURA 5:** Teor de amido na semente de frutos de café, em diferentes estádios do desenvolvimento (UFLA, 2002). (Média de 3 repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%)

Resultados semelhantes ao decréscimo no teor de amido foram obtidos por Terra et al. (1983) em bananas. O teor de amido decresceu lentamente, após o pico respiratório e depois disso, esse decréscimo ocorreu rapidamente, inversamente aos resultados encontrados para a sacarose.

Os mesmos autores concluíram que a transformação do amido para sacarose poderia ser um caminho para a degradação de polissacarídeos, durante o amadurecimento de banana, pois à medida que aumentava a degradação do amido, aumentava também, o conteúdo de sacarose e açúcares solúveis. Os açúcares observados e mudanças nas atividades das enzimas indicaram que a transformação do amido para sacarose pode ser um mecanismo importante para o decréscimo do amido durante o amadurecimento de bananas.

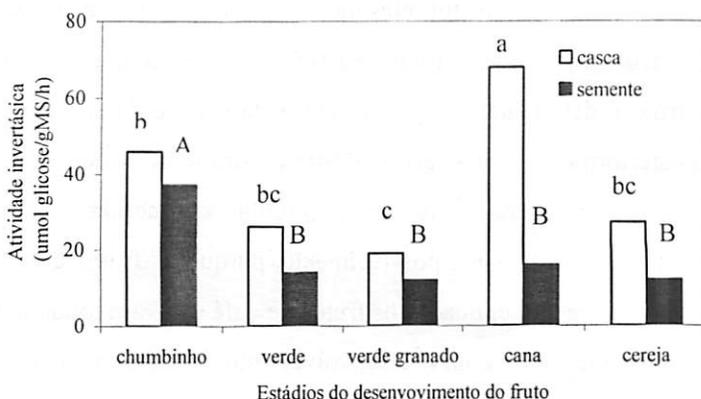
Pelos resultados obtidos neste trabalho ficou claro que também existe uma correlação negativa entre a síntese de amido e conteúdo de sacarose e açúcares solúveis.

No início do desenvolvimento do fruto de café, como já foi citado anteriormente, o teor de amido foi elevado, enquanto o de sacarose e a concentração de açúcares solúveis foram baixos. Isto indica que a sacarose importada pelo fruto é degradada, possivelmente, pela sintase da sacarose, que será discutida posteriormente, fornecendo substrato para síntese de amido nas fases iniciais do desenvolvimento do fruto (estádio chumbinho) e não o contrário, como ocorreu em banana, possivelmente, porque os frutos de banana estavam na fase de maturação, enquanto os frutos de café estavam ainda na fase de desenvolvimento. Entretanto, com o desenvolvimento do fruto, o conteúdo de amido é reduzido, possivelmente, porque a sacarose que continua chegando está sendo direcionada para outras rotas metabólicas (síntese de proteínas de reserva, ou lipídeos, por exemplo). Resultados semelhantes foram encontrados por Doehlert (1990), em endosperma de milho.

#### **4.3 Atividade invertásica em frutos de café**

As atividades das diferentes isoformas da invertase foram determinadas na casca e na semente de frutos de café, em diferentes estádios do desenvolvimento.

Na casca de frutos de café (Figura 6) observa-se que a maior atividade da invertase neutra do citosol (INC) foi obtida no estágio cana-cereja e a menor atividade foi observada em frutos no estágio cana, sendo que nos demais estádios, os valores obtidos foram praticamente iguais. Por outro lado, na semente, a maior atividade foi obtida nos ensaios, com frutos no estágio chumbinho, enquanto nos demais estádios, as atividades foram estatisticamente iguais.



**FIGURA 6:** Atividade da invertase neutra do citosol, na casca e na semente de frutos de café, em diferentes estádios do desenvolvimento (UFLA, 2002). (Média de 3 repetições. Letras minúsculas comparam valores obtidos para a casca e letras maiúsculas comparam valores obtidos para a semente. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%).

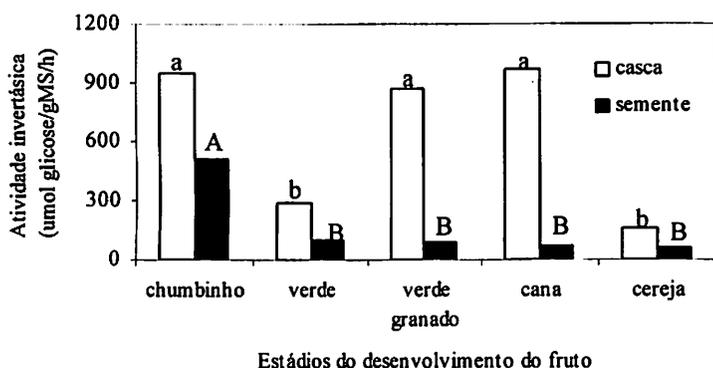
As hexoses produzidas após a hidrólise da sacarose pela INC, em tecidos maduros de internódios de cana de açúcar são utilizadas para as necessidades metabólicas da célula, permitindo o acúmulo de sacarose no vacúolo (Glasziou & Gayler, 1972).

Segundo Winter & Huber (2000), as INC são consideradas enzimas de manutenção, envolvidas na degradação da sacarose, quando a atividade da invertase ácida e da sintase da sacarose são baixas.

Análises bioquímicas de tubérculos de batatas, expressando a INC, revelaram que a sacarose hidrolisada via invertase é usada, preferencialmente, mais na glicólise do que na síntese de amido.

Nas cascas de frutos de café (Figura 7), a maior atividade obtida da invertase ácida do vacúolo (IAV) foi no início do desenvolvimento do fruto, no estágio chumbinho e nos estádios cana e cana-cereja, enquanto que, na semente, a maior atividade foi obtida apenas no primeiro estágio de desenvolvimento, enquanto nos demais estádios as atividades foram estatisticamente iguais.

Durante o estágio chumbinho, enquanto a atividade da invertase ácida vacuolar, na semente, era maior que as demais, o material de reserva que estava sendo acumulado era o amido e, quando esta isoforma passa a não mais predominar, diminui o acúmulo de amido e aumenta o de sacarose.



**FIGURA 7:** Atividade da invertase ácida do vacúolo na casca e na semente de frutos de café, em diferentes estádios do desenvolvimento (UFLA, 2002). (Média de 3 repetições. Letras minúsculas comparam valores obtidos para a casca e letras maiúsculas comparam valores obtidos para a semente. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%).

\* Os estudos realizados por meio da genética molecular, têm confirmado a importância da IAV na regulação da composição de açúcares, em tecidos fonte e dreno (Winter & Huber, 2000).

Huber & Huber (1992) verificaram que algumas espécies acumulam sacarose como produto final da fotossíntese, enquanto outras acumulam amido. Essas contêm invertases ácidas, atuando nos vacúolos que, provavelmente, evitam o acúmulo de sacarose. Huber (1989), também verificou que em tomates, quando as atividades das invertases ácidas vacuolares eram altas, não havia acúmulo de sacarose. Zhu et al. (1997) observou uma correlação inversa entre o acúmulo de carboidratos solúveis, em internódios de cana de açúcar e atividade da invertase vacuolar.

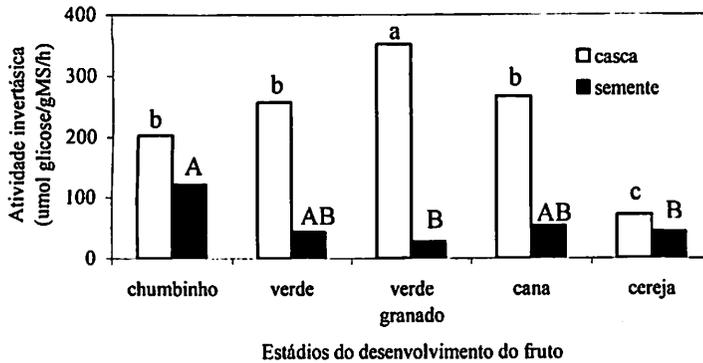
# Pode-se associar altos valores para atividade da invertase ácida às regiões de intensa divisão e alongamento celular e maior demanda de hexoses, nos processos biossintéticos das regiões meristemáticas durante a fase de crescimento (Glasziou & Gayler, 1972; Huber, 1992).

Estudos realizados por Kock et al. (1992) com a invertase vacuolar em milho, mostraram que as invertases estão unicamente posicionadas para fornecer hexoses para expansão da célula, durante o desenvolvimento do grão e durante a polinização. Todavia, não parece ser esta a função da IAV, no caso específico de frutos de café, já que a maior atividade para essa isoenzima foi obtida num estágio que precede o da expansão celular. É interessante notar que a atividade da IAV pode regular a entrada de água na célula, condição necessária para que ocorra a expansão celular, uma vez que ela pode dobrar a concentração de solutos osmoticamente ativos, ao produzir duas moléculas de hexose a partir de uma molécula de sacarose, sem alterar a quantidade de biomassa seca do fruto.

Além disso, as concentrações de açúcares solúveis totais e redutores (Figura 3) foram inferiores nos dois primeiros estádios do desenvolvimento da

semente de café, possivelmente, pela diluição dos mesmos em tecidos altamente hidratados.

A invertase ácida da parede celular (IAPC) (Figura 8) apresentou maior atividade na casca no estágio cana, enquanto que na semente foram nos estádios chumbinho, verde e cana-cereja.



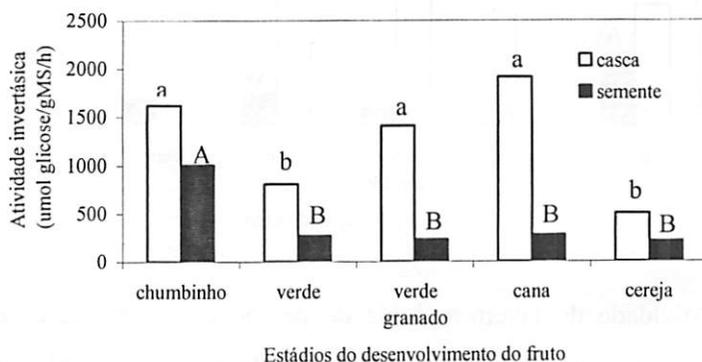
**FIGURA 8:** Atividade da invertase ácida da parede celular na casca e na semente de frutos de café, em diferentes estádios do desenvolvimento (UFLA, 2002). (Média de 3 repetições. Letras minúsculas comparam valores obtidos para a casca e letras maiúsculas comparam valores obtidos para a semente. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%).

As invertases da parede celular ou apoplásticas desempenham um importante papel no descarregamento do floema, mantendo um gradiente de concentração da fonte para o dreno (Winter & Huber, 2000).

A IAPC está relacionada ao mecanismo de translocação de sacarose do apoplasto para o simplasto (Glasziou & Gayler, 1972), ou seja, regula a entrada de hexoses para o interior da célula. Esses resultados são semelhantes aos

encontrados em frutos de tomate por Ho (1996), onde a atividade da IAPC não apresentou um padrão durante o acúmulo de biomassa seco ou tamanho do fruto. Sendo assim, é improvável que a atividade da IAPC seja o fator limitante para a regulação de importação de assimilado.

Na casca de frutos de café, a atividade total (Figura 9) não apresentou um padrão, em relação ao desenvolvimento do fruto, ao contrário do que ocorreu na semente, apresentando atividades decrescentes do estágio chumbinho até o verde e mantendo-se constante até o último estágio.



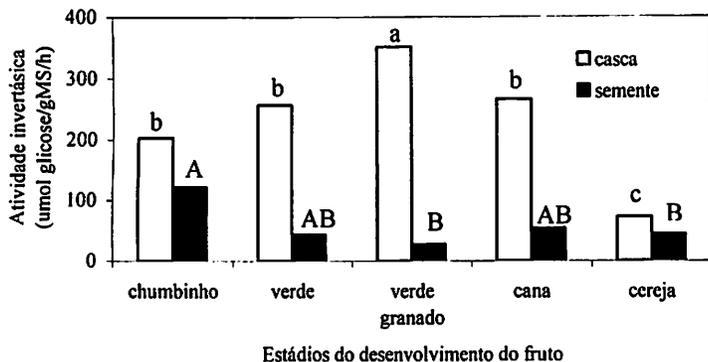
**FIGURA 9:** Atividade invertásica total na casca e na semente de frutos de café, em diferentes estádios do desenvolvimento (UFLA, 2002). (Média de 3 repetições. Letras minúsculas comparam valores obtidos para a casca e letras maiúsculas comparam valores obtidos para a semente. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%).

Resultados semelhantes foram obtidos por Hajirezaei et al. (2000) em tubérculos de batata, onde a atividade da invertase foi alta nos estádios iniciais seguida de um declínio durante a maturação.

Weber & Roitsch (2000) após estudarem as três isoenzimas invertásicas (extracelular, vacuolar e neutra) em cenoura, revelaram que essas enzimas

semente de café, possivelmente, pela diluição dos mesmos em tecidos altamente hidratados.

A invertase ácida da parede celular (IAPC) (Figura 8) apresentou maior atividade na casca no estágio cana, enquanto que na semente foram nos estádios chumbinho, verde e cana-cereja.



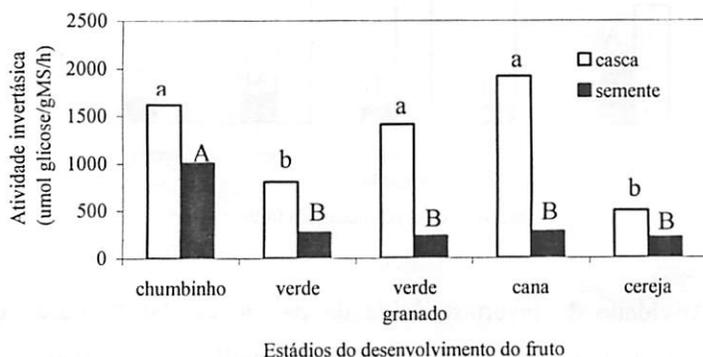
**FIGURA 8:** Atividade da invertase ácida da parede celular na casca e na semente de frutos de café, em diferentes estádios do desenvolvimento (UFLA, 2002). (Média de 3 repetições. Letras minúsculas comparam valores obtidos para a casca e letras maiúsculas comparam valores obtidos para a semente. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%).

As invertases da parede celular ou apoplásticas desempenham um importante papel no descarregamento do floema, mantendo um gradiente de concentração da fonte para o dreno (Winter & Huber, 2000).

A IAPC está relacionada ao mecanismo de translocação de sacarose do apoplasto para o simplasto (Glasziou & Gayler, 1972), ou seja, regula a entrada de hexoses para o interior da célula. Esses resultados são semelhantes aos

encontrados em frutos de tomate por Ho (1996), onde a atividade da IAPC não apresentou um padrão durante o acúmulo de biomassa seco ou tamanho do fruto. Sendo assim, é improvável que a atividade da IAPC seja o fator limitante para a regulação de importação de assimilado.

Na casca de frutos de café, a atividade total (Figura 9) não apresentou um padrão, em relação ao desenvolvimento do fruto, ao contrário do que ocorreu na semente, apresentando atividades decrescentes do estágio chumbinho até o verde e mantendo-se constante até o último estágio.



**FIGURA 9:** Atividade invertásica total na casca e na semente de frutos de café, em diferentes estádios do desenvolvimento (UFLA, 2002). (Média de 3 repetições. Letras minúsculas comparam valores obtidos para a casca e letras maiúsculas comparam valores obtidos para a semente. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%).

Resultados semelhantes foram obtidos por Hajirezaei et al. (2000) em tubérculos de batata, onde a atividade da invertase foi alta nos estádios iniciais seguida de um declínio durante a maturação.

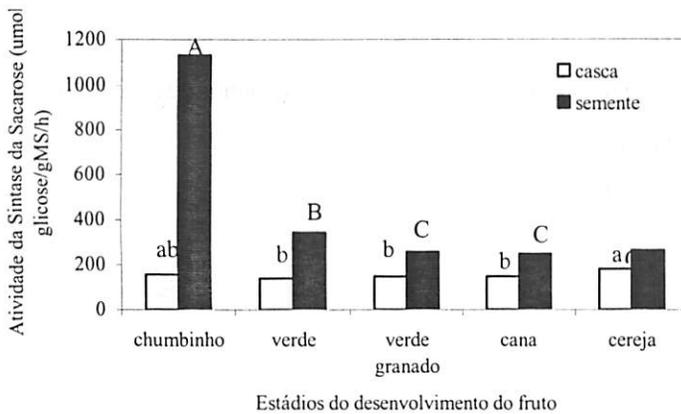
Weber & Roitsch (2000) após estudarem as três isoenzimas invertásicas (extracelular, vacuolar e neutra) em cenoura, revelaram que essas enzimas

desempenham papel crucial no particionamento de sacarose, no início do desenvolvimento da planta. Pelo fato das invertases produzirem dois açúcares, essas enzimas possuem uma importante função na regulação da expressão gênica, produzindo sinais e influenciando uma série de processos.

#### 4.4 Atividade da sintase da sacarose em frutos de café

As atividades da sintase da sacarose na casca e na semente de frutos de café são apresentadas na Figura 10

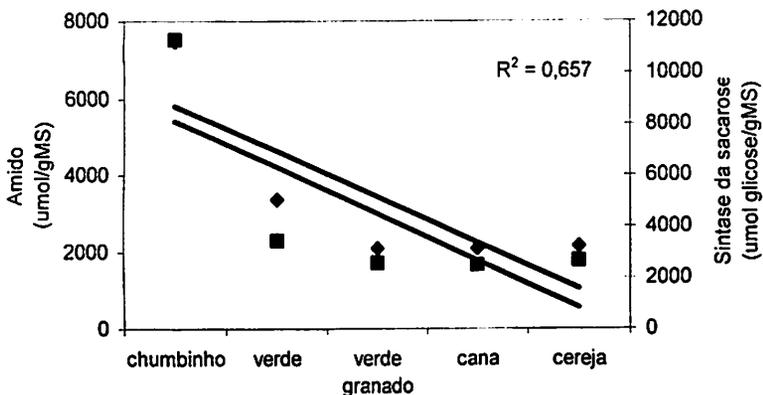
A atividade da sintase da sacarose na casca foi praticamente constante, durante o desenvolvimento do fruto, enquanto que na semente, o comportamento dessa enzima foi decrescente, do estágio chumbinho até o cana, permanecendo inalterado até o último estágio.



**FIGURA 10:** Atividade da sintase da sacarose na casca e na semente de frutos de café, em diferentes estádios do desenvolvimento (UFLA, 2002). (Média de 3 repetições. Letras minúsculas comparam valores obtidos para a casca e letras maiúsculas comparam valores obtidos para a semente. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%).

Esses resultados confirmam os obtidos por Dali et al. (1992), que relataram que as maiores atividades da sintase da sacarose foram em frutos jovens, quando está ativo o crescimento no tecido. O mesmo autor afirma que a sintase da sacarose pode ser um indicador do estágio de desenvolvimento do fruto de tomate, ao invés de indicador da taxa de descarregamento do dreno. A atividade da sintase da sacarose, aumenta após a antese e declina em níveis não detectáveis, no final do processo de maturação do fruto (Demnitz-Kinh, 1993). Esse padrão foi semelhante ao das invertases totais na semente, porém a sintase da sacarose apresentou atividades aproximadamente 10 vezes maiores. Estudos fisiológicos e análises cinéticas sugerem que “in vivo” a sintase da sacarose desempenha papel principal na clivagem da sacarose em tecidos dreno (Sturn & Tang, 1999).

O comportamento da sintase da sacarose na semente de café foi paralelo ao acúmulo de amido (Figura 11), como observado por Robinson et al. (1988) em frutos de tomate e por Doehlert (1990) em milho.



**FIGURA 11:** Correlação entre a atividade da sintase da sacarose e o teor de amido em sementes de frutos de café, em diferentes estádios do desenvolvimento.

Uma das principais funções da sintase da sacarose é direcionar a sacarose para síntese de amido em grãos de armazenamento (Chourey & Nelson, 1976; Claussen et al., 1985; Doehlert, 1990). Nesse processo, a UDP-glicose produzida é convertida em glicose-1-fosfato pela UDP-glicose pirofosforilase, para produção de ADP-glicose, substrato para síntese de amido. Também foi observado por Zrenner et al. (1995) que a redução da atividade da sintase da sacarose resultou num forte decréscimo no acúmulo de amido em tubérculos de batatas de plantas transgênicas. Em sementes de feijão, foi observado um pico na atividade da sintase da sacarose, quando esta começa a acumular amido, fornecendo substrato para esta síntese (Sung et al., 1994).

A sintase da sacarose parece ser uma das enzimas chave, na conversão de sacarose em amido, como ocorreu nos frutos de café estudados. Quando a atividade da sintase da sacarose era alta, o teor de amido era elevado e o de sacarose era baixo. Possivelmente, grande parte da sacarose importada pelo fruto era hidrolisada pela sintase da sacarose, fornecendo substrato para síntese de

era hidrolisada pela sintase da sacarose, fornecendo substrato para síntese de amido e à medida que diminuía a atividade da sintase da sacarose, diminuía, também, o conteúdo de amido e aumentava a concentração de sacarose na semente. A sacarose para ser utilizada para síntese de amido deve ser hidrolisada pela sintase da sacarose, pois requer PPi para a pirofosforilação da UDP-glicose, ao contrário da invertase.

Essa enzima, também, está envolvida no processo de disponibilização de carboidratos para a via glicolítica durante condições anaeróbicas (Springer et al, 1986) e de UDP-glicose para a síntese da parede celular em órgãos dreno (Martin et al., 1993).

Evidências bioquímicas e genéticas sugerem que a atividade da sintase da sacarose é possivelmente correlacionada à força do dreno, principalmente, em regiões meristemáticas (Hajirezaei et al., 2000).

Pelos resultados obtidos e apesar do comportamento semelhante da invertase total e da sintase da sacarose é possível sugerir que a sacarose transportada para as sementes de café seja descarregada, principalmente, pelo simplasto e hidrolisada pela sintase da sacarose, localizada no citosol da célula, podendo também ocorrer o descarregamento apoplástico, apesar de não parecer ser a principal forma de descarregamento.

Em tubérculos de batata e frutos de tomate, o descarregamento também ocorre simplasticamente (Oparka, 1986; Oparka & Prior, 1988; Miron & Schaffer, 1991).

## 5 CONCLUSÕES

Durante o desenvolvimento do fruto de café, o descarregamento preferencial do floema ocorre pela rota simplástica, mediada pela sintase da sacarose no interior da célula.

A sintase da sacarose está envolvida principalmente na síntese de amido, pela degradação da sacarose importada pelo fruto, decrescendo, significativamente, do estágio chumbinho até o cereja.

A enzima sintase da sacarose é um fator limitante na assimilação de sacarose pelo fruto.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMOR, Y.; HAIGLER, C. H.; WAINSCOTT, M.; DELMER, D. A membrane associated form of SuSy and its potential role in the synthesis of cellulose and callose in plants. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 92, n. 20, p. 9353-9357, Sept. 1995.

ANUARIO ESTATÍSTICO DO CAFÉ. 6. ed. Rio de Janeiro, 2000/2001. 161p.

Ap RESS, T. Sucrose metabolism. In: LEWIS, D. H. (Ed.). **Storage carbohydrates in vascular plants**. Cambridge: University Press, 1984. p.53-73.

BARRAT, D. H. P.; BARBER, L.; KRUGER, N. J.; SMITH, A. M.; WANG, T. L.; MARTIN, E. Multiple, distinct isoforms of sucrose synthase in pea. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, n. 2, p. 655-664, Oct. 2001.

CHOUREY, P. S.; NELSON, O. E. The enzymatic deficiency conditional by the *shrubken-1* mutation in maize. **Biochemical Genetics**, New York, v. 14, n. 11, p. 1041-1055, 1976.

CHOUREY, P. S.; TALIERCIO, E. W.; CARLSON, S. J.; RUAN, Y. L. Genetic evidence that the two isoenzymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis. **Molecular General Genetics**, New York, v. 259, n. 1, p. 88-96, July 1998.

CLAUSSEN, W.; LOVEYS, B. R.; HAWKER, J. S. Comparative investigations on the distribution of sucrose synthase activity and invertase activity within growing mature and old leaves of some 3-carbon photosynthetic pathway species. **Plant Physiology**, Rockville, v. 65, n. 2, p. 275-280, Feb. 1985.

DALE, E. M.; HOUSLEY, T. L. Sucrose synthase activity in developing wheat endosperm differing in maximum weight. **Plant Physiology**, Rockville, v. 82, n. 1, p. 7-10, Sept. 1986.

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**, Rockville, v. 99, n. 2. p. 434-438, June 1992.

- DAMON, S.; HEWITT, J.; NIERDER, M.; BENNETT, A. B. Sink metabolism in tomato fruit. II. Phloem unloading and sugar uptake **Plant Physiology**, Rockville, v. 87, n. 3, p. 731-736, July 1988.
- DEMNITZ-KING, A. C. Sucrose metabolism in relation to import and compartmentation of carbohydrates in developing tomato fruit. **Plant Physiology**, Rockville, v. 95, n. 2, p. 420-425, Feb. 1993.
- DÉJARDIN, A.; ROCHAT, C.; WUILLÉM, S.; BOUTIN, J. P. Contribution of sucrose synthase, ADP - glucose pyrophosphorilase and starch synthase to starch synthesis in developing pea seeds. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 20, n. 11, p. 1421-1430, Nov. 1997.
- DOEHLERT, D. C. Distribution of enzymes activities within the developing maize kernel in relation to starch, oil, and protein accumulation. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 78, n. 4, p. 560-567, Apr. 1990.
- EHRET, D. L.; HO, L. C. The effects of salinity on dry matter partitioning and fruit growth in tomatoes grown in nutrient film culture. **Journal of Horticultural Science**, Ahsford, v. 61, n. 3, p. 361-367, July 1986.
- ESCHERICH, W. Free space invertase, its possible role in phloem unloading. **Berich der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, Jena v. 93, p. 363-378, 1980.
- FARRAR, J. F. The whole plant: carbon partitioning during development. In: POLLOCK C. J, FARRAR, J. F, GORDON, A. J. (Ed.). **Carbon partitioning within and between organisms**. Oxford: BIOS Scientific, 1992. p. 163-79.
- FAZUOLI, L. C. Genética e Melhoramento do Cafeeiro. In RENA, A. B; MALAVOLTA, E.; ROCHA, M.; YAMADA, T. (Ed.). **Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade do cafeeiro**. Piracicaba: POTAFÓS, 1986. p.87-113.
- GLASZIOU, K. T.; GAYLER, K. R. Storage of sugar in stalks of sugarcane. **Botanical Review**, Brisbane, v. 38, p. 471-490, 1972.
- HAJIREZAEI, M. R.; TAKAHATA, Y.; TRETHERWEY, R. N.; WILLMITZER, L.; SONNEWALD, U. Impact of elevated cytosolic and apoplastic invertase activity on carbon metabolism during potato tuber development. **Journal Experimental Botany**, Lancaster, v. 51, n. 341, p. 439-445, Jan. 2000.

- HO, L. C. The mechanism of assimilate partitioning and carbohydrate compartmentation in fruit in relation to the quality and yield for tomato. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 47, n. 301, p. 1239-1243, Aug. 1996.
- HO, L. C. Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink strength. Annual Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink strength. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 39, p. 355-378, 1988.
- HO, L. C. Regulation of assimilate translocation between leaves and fruits in the tomato. **Annals of Botany**, London, v. 43, n. 1, p. 437-448, 1979.
- HO, L. C.; GRANGE, R. I.; PICKEN, A. J. An analysis of the accumulation of water and dry matter in tomato fruit. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 10, n. 2, p. 157-162, Mar. 1987.
- HUBBARD, N. L.; PHARR, M.; HUBER, S. C. Sucrose phosphate syntase and other sucrose metabolizing enzymes in fruits of various species. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 82, n. 2, p. 191-196, June 1991.
- HUBER, S. C. Biochemical mechanism for regulation of sucrose accumulation in leaves during photosynthesis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 91, n. 2, p. 656-662, Oct. 1989.
- HUBER, S. C.; HUBER, J. L. Role of sucrose-phosphate synthase in sucrose metabolism in leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, n. 4, p. 1275-1278, Aug. 1992.
- JOHNSON, C.; HALL, J. L.; HO, L. C. Pathways of uptake and accumulation of sugars in tomato fruit. **Annals of Botany**, London, v. 61, n. 5, p. 593-603, May 1988.
- KOCK, K. E.; NOLTE, K. D.; DUKE, E. R.; McCARTY, D. R.; AVIGNE, W. T. Sugar levels modulate differential expression of maize sucrose synthase genes. **The Plant Cell**, Rockville, v. 4, n. 1, p. 59-69, Jan. 1992
- LALONDE, S.; BOLES, E.; HELLMANN, H.; BARKER, L.; PATRICK, J. W.; FROMMER, W. B.; WARD, J. M. The dual function sugar carriers: transport and sugar sensing. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 4, p. 707-726, Apr. 1999.

- LANG, A.; DURING, H. Partining control by water potential gradient: evidence compartmentation breakdown. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, n.242, p. 1117-1122, Sept. 1991.
- LANG, A.; THORPE, M. R. Water potential, translocation and assimilate partitioning. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 37, n. 177, p. 495-503, Apr. 1986.
- LOWELL, C. A.; TOMLINSON, P. T.; KOCK, K. E. Sucrose metabolizing enzymes in transpor tissues and adjacent sink structures in developing citrus fruit. **Plant Physiology**, Rockville, v. 90, p. 1394-1402, 1989.
- MARCELIS, L. F. M. Fruit growth and biomass allocation to the fruits in cucumber. 1. Effect of fruit load and temperature. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 54, n. 2, p. 107-121, May 1993.
- MARCELIS, L. F. M. Sink strength as a determinant of dry matter partitioning in the whole plant. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, n. 301, p. 1282-1291, Aug. 1996.
- MARTIN, T.; FROMMER, W. B.; SALANOUBAT, M.; WILLMITZER, L. Expression of an Arabidopsis sucrose synthase gene indicates a role in metabolization of sucrose both during phloem loading and in sink organs. **The Plant Journal**, Oxford, v. 4, n. 2, p. 177-181, Aud. 1993.
- MAZZAFERA, P.; ROBINSON, S. P. Characterization of polyphenol oxidase in coffee. **Phytochemistry**, Oxford, v. 55, n. 4, p. 285-296, Oct. 2000.
- MENDES, A. N. G.; GUIMARÃES, R. J. **Economia cafeeira: o agrobusiness**. Lavras: UFLA, FAEPE, 1997. 59p.
- MILLER, G. L. Use dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MINCHIN, P. E. H.; THORPE, M. R.; FARRAR, J. F. A simple mechanistic model of phloem transport which explains sink priority. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 44, n. 262, p. 947-955, May 1993.
- MIRON, D.; SCHAFFER, A. A. Sucrose phosphate synthase, sucrose synthase, and the sucrose accumulating *Lycopersicon hirsutum* Humb. And Bonpl. **Plant Physiology**, Rockville, v. 95, n. 2, p. 623-627, Feb. 1991.

MORRIS, D. A.; ARTHUR, E. D. An association between acid invertase activity and cell growth during leaf expansion in *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 35, n. 158, p. 1369-1379, Sept. 1984.

NAKAI, T.; TONOUCI, N.; KONISHI, T.; TSUCHIDA, T.; YOSHINAGA, F.; SAKAI, F.; HAYASHI, T. Enhancement of cellulose production by expression of sucrose synthase in *Acetobacter xylinum*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 96, p. 14-18, 1999.

OFFLER, C. E.; HORDER, B. The cellular pathway of short distance transfer of photosynthates in developing tomato fruit. **Plant Physiology**, Rockville, v. 91, p. 41, 1992. Supplement.

OPARKA, K. J. Phloem unloading in the potato tuber. Pathways and sites of ATPase. **Protoplasma**, Vienna, v. 131, n. 3, p. 201-210, 1986

OPARKA, K. J.; PRIOR, D. A. M. Movement of lucifer yellow CH in potato tuber storage tissues: a comparison of symplastic and apoplastic transport. **Planta**, Berlin, v. 176, n. 4, p. 533-540, Dec. 1988.

PATE, J. S.; PEOPLES, M. B.; VANBEL, A. J. E.; KUO, J.; ATKINS, C. A. Diurnal water balance of the coulepa fruit. **Plant Physiology**, Rockville, v. 77, n. 1, p. 148-156, Jan. 1985.

PATRICK, J. W. Assimilate partitioning in relation crop productivity. **HortScience**, Alexandria, v. 23, n. 1, p. 33-40, Feb. 1988.

PRESSEY, R. Potato sucrose synthase: Purification properties, and changes in activity associated with maturation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 44, n. 5, p. 759-764, May 1969.

QUICK, W. P. Sucrose metabolism in sources and sinks. In: ZAMSKI, E. E. SCHAFFER, A. A. (Ed.). **Photoassimilate distribution in plants**. New York: Marcel Dekker, 1996. p.115-160.

RENA, A.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 126, p. 26-40, jun. 1995.

RIBEIRO, M. F. F.; MAZZOMO, C. P. L.; DUARTE, L. H.; FENELON, A. N. Tradição e moderno se combinam na definição de uma nova trajetória em busca da competitividade. In: \_\_\_\_\_. **O caso da cadeia agroalimentar do**

café no sul de Minas Gerais: diagnósticos para discussão. Lavras: UFLA, 1998. p.1-17.

ROBINSON, N. L.; HEWITT, J. D.; BENNETT, A. B. Sink metabolism in tomato fruit. I. Developmental changes in carbohydrate metabolizing enzymes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 87, n. 3, p. 727-730, July 1988.

ROSS, H. A.; DAVIES, H. V. Sucrose metabolism in tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). Effects of sink removal and sucrose flux on sucrose-degrading enzymes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 98, n. 1, p. 287-293, Jan. 1992.

SILVA, O. M.; LEITE, C. A. M. Competitividade e custos do café no Brasil e no exterior. In: ZAMBOLIM, L. **Café: produtividade, qualidade e sustentabilidade**. Viçosa: UFV, 2000. p.27-50

SPRINGER, B.; WERR, W.; STARLINGER, P.; BENNETT, D. C.; ZOKOLICA, M. The *shrunk* gene on chromosome 9 of *Zea mays* L. is expressed in various plant tissues and encodes an anaerobic protein. **Molecular and General Genetics**, New York, v. 205, n. 3, p. 461-468, 1986.

STURM, A.; TANG, G. Q. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 4, n.10, p. 401-407, Oct. 1999.

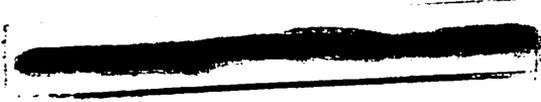
SUN, J. D.; LOBODA, T.; SUNG, S. S.; LOBODA, T. Synthase in wild tomato, *Lycopersicon chemielewskii*, and tomato fruit sink strength. **Plant Physiology**, Rockville, v. 98, n. 3, p. 1163-1169, Mar. 1992.

SUNG, S. S.; KORMANIK, P. P.; XU, D. P.; BLACK, C. C. Sucrose metabolic pathways in sweetgum and pecan seedlings. **Tree Physiology**, Victoria, v. 5, n. 1, p. 39-52, Mar. 1989a.

SUNG, S. S.; LOBODA, T.; LOBODA, T. Sucrose, pyrophosphate and plastid metabolism in relation to cellular communication. In **Perspective in Biochemical and Genetic Regulation of Photosynthesis**, v. 10, p. 55-68, 1990.

SUNG, S. S.; SHEIH, W. J.; GEIGER, D. R.; BLACK, C. C. Growth, sucrose synthase, and invertase activities of developing *Phaseolus vulgaris* L. fruits. **Plant Cell and Environmental**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 419-426, Apr. 1994.

- SUNG, S. S.; XU, D. P.; BLACK, C. C. Identification of actively filling sucrose sinks. **Plant Physiology**, Rockville, v. 89, n. 3, p. 1117-1121, Mar. 1989b.
- SUNG, S. S.; XU, D. P.; GALLOWAY, C. M.; BLACK, C. C. Areassessment of glycolysis and gluconeogenesis in higher plants. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 72, n. 3, p. 650-654, Mar. 1988.
- TERRA, N. N.; GARCIA, E.; LAJOLO, F. M. Starch-sugar transformation during banana ripening: The behavior of UDP glucose pyrophosphorilase, sucrose synthase and invertase. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 48, n. 1, p. 1097-1101, Jan./Feb. 1983.
- VANHANDEL, E. Direct microdetermination of sucrose. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 22, n. 2, p. 280-283, 1968.
- VERKLEIJ, F. N.; CHALLA, H. Diurnal export and carbon economy in an expanding source leaf of cucumber at contrasting source and sink temperature. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 74, n. 2, p. 284-293, Oct. 1988.
- WANG, F.; SMITH, A. G.; BRENNER, M. L. Temporal and spatial expression pattern of sucrose synthase during tomato fruit development. **Plant Physiology**, Rockville, v. 104, n. 2, p. 535-540, Feb. 1994.
- WEBER, H. ROITSCH, T. Invertases and life beyond sucrose cleavage. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 47-48, Feb. 2000.
- WESCHKE, W.; PANITZ, R.; SAUER, N.; WANG, Q.; NEUBOHN, B.; WEBWE, H.; WOBUS, U. Sucrose transport into barley seeds molecular characterization of two transporter and implications for seed development and starch accumulation. **The Plant Journal**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 455-467, Mar. 2000.
- WINTER, H.; HUBER, S. C. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v. 19, n. 1, p. 31-67, Jan. 2000.
- WOLSWINKEL, P. Phloem unloading and turgor-sensitive transport: factors involved in sink control of assimilate partitioning. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 65, n. 3, p. 331-339, Nov. 1985.



YEMM, E. W.; COCCKING, E. C. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemistry Journal**, London, v. 57, n. 3, p. 508-514, 1954.

ZHU, Y. J.; KOMOR, E.; MOORE, P. H. Sucrose accumulation in the sugarcane stem is regulated by the difference between the activities of soluble acid invertase and sucrose synthase phosphate synthase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 115, n. 2, p. 609-616, Oct. 1997.

ZRENNER, R.; SALANOUBAT, M.; WILLMITZER, L.; SONNEWALD, U. Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L. ). **The Plant Journal**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 97-107, Jan. 1995.