

Some Genes Encoding Enzymes Involved in the Caffeine Biosynthesis of *Coffea pseudozanguebariae* Are Regulated by an Incomplete Splicing of their Pre-messenger RNA

E. CAILLIEUX, E. BULLIER, C. MOREAU, C. CAMPA, M. NOIROT, S. HAMON, A. DE KOCHKO

Centre IRD, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex, France

SUMMARY

Three methylation steps occur at the end of caffeine biosynthesis. They are ensured by three N-methyltransferases (NMT), encoded by a multigene family. Using specific primers, the genes coding the NMT could be amplified, cloned and sequenced in some *Coffea* species having different caffeine contents. These genes have a very conserved structure (four exons, three introns).

The NMT genes expression had been studied in order to explain fruit caffeine content variations between two species namely: *Coffea canephora* and *C. pseudozanguebariae*, which present a quasi, null accumulation of caffeine in seeds. Analyses by RT-PCR on fruit RNAs of *C. pseudozanguebariae* at various stages of maturation indicated that all the genes of NMT were expressed. However, in this species, splicing of introns is disturbed in approximately 16% of the cases. This disturbance results in the skipping of the first and/or second intron, the partial excision of the second intron or the excision of an exonic fragment with the intron located downstream. The third intron is always correctly spliced. In all the cases, these aberrant excisions would lead to the synthesis of truncated proteins and consequently the synthesis of the final product could be affected.

RÉSUMÉ

Trois méthylations interviennent dans la voie de biosynthèse de la caféine. Elles sont assurées par des N-méthyltransférases (NMT), codées par une famille multigénique. Grâce à des amorces spécifiques, les gènes codant les NMT ont pu être amplifiés, clonés et séquencés chez plusieurs espèces de caféiers ayant des teneurs en caféine différentes. Ces gènes ont une structure très conservées (quatre exons, trois introns).

L'expression des gènes de NMT a été étudiée pour tenter d'expliquer les variations de teneur en caféine dans les fruits chez deux espèces: *Coffea canephora* et *C. pseudozanguebariae* qui présente une accumulation quasi nulle de caféine dans les graines. Des analyses par RT-PCR sur fruits de *C. pseudozanguebariae* à différents stades de développement et de maturation ont indiqué que tous les gènes de NMT étaient exprimés. Cependant, chez cette espèce, l'épissage des introns est perturbé dans environ 16% des cas. Cette perturbation résulte en la non excision du premier et/ou deuxième intron, l'excision partielle du deuxième intron ou encore l'excision d'un fragment d'exon avec l'intron situé en aval. Le troisième intron est toujours excisé. Dans tous les cas, ces excisions aberrantes conduisent à la synthèse de protéines tronquées et la synthèse de produit final pourrait en être affectée.