**BIOSSÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE FRUTANOS EM
DIFERENTES REGIÕES DO RIZÓFORO DE *Vernonia herbacea*
(Vell.) Rusby (ASTERACEAE)**

MARIA TERESA PORTES

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre
em Ciências, Área de Concentração: Fisiologia
e Bioquímica de Plantas

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo – Brasil
Julho – 2005

**BIOSSÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE FRUTANOS EM
DIFERENTES REGIÕES DO RIZÓFORO DE *Vernonia herbacea*
(Vell.) Rusby (ASTERACEAE)**

MARIA TERESA PORTES

Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas

Orientador: Prof^a Dra. **Maria Angela Machado de Carvalho**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre
em Ciências, Área de Concentração: Fisiologia
e Bioquímica de Plantas

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo – Brasil
Julho - 2005

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Portes, Maria Teresa

Biossíntese e degradação de frutanos em diferentes regiões do rizóforo de *Veronia herbacea* (Vell.) Rus(Asteraceae) / Maria Teresa Portes. - - Piracicaba, 2005.
111 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.
Bibliografia.

1. Asteraceae 2. Biossíntese 3. Carboidrato vegetal 4. Compostae 5. Enzima vegetal
6. Metabolismo de carboidrato I. Título

CDD 581.19248

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

A Rosa, Regina e Elisabete

DEDICO

“O que agora é comprovado, antigamente era só imaginado”

William Blake

AGRADECIMENTOS

À minha família, Rosa, Regina e Elisabete pela educação, exemplo, princípios, valores e desprendimento, mas acima de tudo pela união, apoio e compreensão nos momentos de ausência.

À minha orientadora, Dra. Maria Angela Machado de Carvalho, pelos ensinamentos, pela oportunidade, confiança, credibilidade e inestimável contribuição ao meu crescimento científico e acadêmico.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo, especialmente a chefe da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Dra. Lílían Beatriz Penteado Zaidan, por possibilitar a realização do trabalho.

Aos docentes do Programa de Pós Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas da ESALQ/USP.

Às minhas amigas-irmãs Vanessa e Priscila pela amizade verdadeira, cumplicidade e companheirismo de todos esses anos.

À doce Carol, pela linda amizade, intensidade, alegria, compaixão e exemplo de altruísmo, além da hospedagem em Piracicaba.

À Di-lúvio pela amizade, fraternidade, companheirismo e pelos alegres momentos de diversão e intensa descontração.

À Ana Helena pela amizade, convivência e inesquecíveis noites insones, mas especialmente pela acolhida no período em que moramos juntas em Piracicaba.

À Amanda Asega pela oportunidade, incentivo, apoio, amizade, auxílio e presença até mesmo, muitas vezes, à distância.

À Gaya pela amizade, entusiasmo e pelo companheirismo nessa incrível jornada, movida a sincronicidades, desafios e conquistas.

Aos amigos de Piracicaba, Baguiña, Bulie, Katota, Ênio, Foker, Relπ, Henrique, Malhada, Rogério, Saulo, Wiri e a todas as meninas da República Kza Verde.

Aos amigos e funcionários da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica de São Paulo, Aidar, Aline, Amanda de Souza, Amanda, Ana Russa, C1, C2, César, Cida, Claudinha, Danilo, Dona Helena, Fabinho, Fernanda, Flávio, Giovanna, Grazi, Igor, João, Kelly, Lourdes, Ludmila, Maraba, Dra. Márcia, Marília, Marina, Mário, Mary Monteiro, Mary, Paola, Pinho, Dra. Rita, Sueli, Tiné, Vanessa Oliveira e Vanessa Rebouças pela ajuda, amizade e agradável convivência no laboratório.

Ao Gustavo Maia de Souza pelas agradáveis e instigantes discussões, inestimável contribuição científica e ajuda na realização das análises estatísticas.

Ao professor Lázaro Eustáquio Pereira Peres do Programa de Pós Graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas da ESALQ/USP, pelas oportunidades, ensinamentos e confiança.

À Solizéte pela indispensável ajuda nos momentos distantes da ESALQ.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processo nº 02/11227-1) pela bolsa concedida e a última também pelo auxílio financeiro ao projeto temático (BIOTASP/FAPESP).

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	viii
SUMMARY	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	7
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 Material Vegetal	25
3.2 Extração de carboidratos solúveis	29
3.3 Análise quantitativa dos frutanos	30
3.4 Análise qualitativa dos frutanos	30
3.5 Extração enzimática	32
3.6 Ensaio enzimático	33
3.7 Análise das atividades enzimáticas	33
3.8 Quantificação de proteínas	35
3.9 Análise dos dados	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5 CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

**BIOSSÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE FRUTANOS EM DIFERENTES
REGIÕES DO RIZÓFORO DE *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby
(ASTERACEAE)**

Autora: MARIA TERESA PORTES

Orientador: Prof^a Dra. MARIA ANGELA MACHADO DE CARVALHO

RESUMO

Vernonia herbacea, Asteraceae, possui órgãos subterrâneos de reserva ramificados, os rizóforos, que acumulam frutanos do tipo inulina como carboidratos de reserva. Os frutanos são polímeros de frutose que são sintetizados pelas enzimas SST (sacarose: sacarose frutossiltransferase) e FFT (frutano:frutano frutossiltransferase) e despolimerizados pela FEH (frutano exohidrolase). Plantas desta espécie entram em dormência no final do outono, quando perdem os ramos aéreos e rebrotam na primavera seguinte; subsequente ocorre a floração e o crescimento vegetativo no verão; ocorrem variações no teor e na composição dos

frutanos durante o ciclo fenológico das plantas. O rizóforo apresenta crescimento geotrópico positivo, cujo ápice apresenta tecidos mais jovens em crescimento e a rebrota dos novos órgãos aéreos se dá pelo desenvolvimento das gemas situadas na região proximal do rizóforo, localizada próximo à superfície do solo. Considerando estas variações este trabalho visou à análise da distribuição espacial das atividades da SST, FFT, Invertase e FEH, bem do teor e composição dos frutanos nas regiões proximal, mediana e distal dos rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea*, em diferentes fases de desenvolvimento e em plantas induzidas à brotação pela remoção dos órgãos aéreos. Também foram analisados esses parâmetros em plantas na fase vegetativa com os órgãos aéreos intactos ou excisados, mantidas em condições ambientais naturais ou em baixa temperatura. De maneira geral, as enzimas SST e FFT apresentaram atividades mais elevadas em plantas na fase vegetativa, enquanto a FEH apresentou atividade mais elevada em plantas na fase de brotação natural ou induzida e nos tratamentos sob baixa temperatura. Com relação à distribuição espacial das atividades enzimáticas, a SST e FFT apresentaram atividade mais elevada na região distal, que diminuiu no sentido proximal dos rizóforos. A FEH por sua vez apresentou atividade mais elevada na região proximal, diminuindo no sentido distal. Em geral, o conteúdo de fruto-oligossacarídeos foi mais elevado na região distal e diminuiu em direção à região proximal dos rizóforos. Os tratamentos com baixa temperatura levaram a uma maior proporção de fruto-oligossacarídeos, enquanto nas plantas induzidas à brotação, a proporção de fruto-polissacarídeos foi superior. Os menores valores de grau de polimerização médio (GP) das cadeias de frutanos foram detectados na região distal, sugerindo que as cadeias de frutanos

nesses tecidos não apresentam o GP característico da espécie. Valores elevados de GP foram detectados na região proximal, e valores mais elevados ainda, em plantas na fase de brotação e sob baixa temperatura, coincidindo com atividades mais elevadas de FEH. Estes resultados sugerem que o mecanismo de ação da FEH em *V. herbacea* seja do tipo "single chain", pelo qual uma molécula da enzima se liga à cadeia de frutano degradando-a até a molécula de sacarose. Os experimentos realizados possibilitaram algumas deduções a respeito do mecanismo de ação das enzimas envolvidas no metabolismo de frutanos, e um maior conhecimento sobre a dinâmica de variação temporal e espacial destes carboidratos, em diferentes fases de desenvolvimento das plantas e em condições adversas ao desenvolvimento vegetal.

**BIOSYNTHESIS AND DEGRADATION OF FRUCTANS IN
DIFFERENTS REGIONS OF THE RHIZOPHORES OF *Vernonia*
herbacea (Vell.) Rusby (ASTERACEAE)**

Author: MARIA TERESA PORTES

Adviser: Prof^a Dra MARIA ANGELA MACHADO DE CARVALHO

SUMMARY

Vernonia herbacea, Asteraceae, bears branched underground reserve organs, rhizophores, that accumulate inulin-type fructans as reserve carbohydrates. Fructans are fructose polymers, that are synthesized by SST (sucrose: sucrose fructosyltransferase) and FFT (fructan:fructan frutosyltransferase) and mobilized by FEH (fructan exohydrolase). Plants of this species enter dormancy at the end of autumn, with senescence and abscission of the aerial organs and sprout in the following spring; flowering occurs subsequently followed by a period of vegetative growth in the summer. The concentration and composition of fructans vary during

the phenological cycle of the plants. Considering this variation in fructans, and the positive geotropic growth of the rhizophores, with the apex presenting younger tissues (distal region) and the resprouting of the new aerial organs occurring in the opposite end of the organ (proximal region), close to the soil surface, the aim of this work was to analyze the spatial distribution of fructans and fructan metabolizing enzymes in the different regions of the rhizophores (distal, median and proximal) in plants of *Vernonia herbacea* in different developmental phases and plants induced to sprouting by the excision of the aerial organs. These parameters were also analyzed in intact plants in the vegetative phase and in excised plants, kept in natural environmental conditions or in low temperature. In general SST and FFT presented higher activities in plants in the vegetative phase, while FEH presented higher activity during sprouting, either under natural or induced sprouting and in plants under low temperature. Concerning the spatial distribution of the enzyme activities, SST and FFT presented higher activity in the distal region, decreasing towards the proximal region of the rhizophores. The FEH, on the other hand, presented higher activity in the proximal region, decreasing towards the distal region. In general, the content of fructo-oligosaccharides in the phenological phases studied was higher in the distal region and decreased towards the proximal region of the rhizophores. Low temperature led to a higher proportion of fructo-oligosaccharides, while in plants induced to sprouting the proportion of fructo-polysaccharides was higher. The lower values of average degree of polymerization (DP) of fructans chains were detected in the distal region. This indicates that fructan chain length in younger tissues is shorter than that characteristic of

the species. Higher values of mean DP were detected in the proximal region and even higher DP was detected in this region in sprouting plants and in plants under low temperature, coinciding with the higher FEH activity detected in these conditions. These results suggest a mechanism of action for the FEH in *V. herbacea* of the "single chain" type, in which a molecule of the enzyme binds to the fructan chain degrading it completely before binding to the next fructan molecule. These studies allowed us to draw several conclusions regarding the mechanism of action of enzymes involved in the metabolism of fructans in *Vernonia herbacea* and regarding the dynamics of distribution of these carbohydrates and the related enzymes in different phases of development and in adverse conditions for plant development.

1 INTRODUÇÃO

Aproximadamente 50% das espécies que compõem a vegetação herbácea dos cerrados brasileiros possuem órgãos subterrâneos espessados, que acumulam carboidratos utilizados como substâncias de reserva pelas plantas, o que sugere a importância ecológica dessas estruturas (Dietrich & Figueiredo-Ribeiro, 1985; Mantovani & Martins, 1988). Esses órgãos subterrâneos são estruturas perenes que, após a estação seca de inverno, característica do cerrado, dão origem a novos órgãos aéreos (Rachid, 1947), garantindo, portanto, a sobrevivência das plantas durante períodos desfavoráveis.

Triagens realizadas em áreas de cerrado (Figueiredo-Ribeiro *et al.*, 1986; Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro, 1993) mostraram que, dentre os carboidratos de reserva, os frutanos predominam em espécies da família Asteraceae, sendo acumulados nos órgãos subterrâneos de aproximadamente 60% delas. Em 80% dessas espécies, o tipo de frutano detectado foi a inulina (Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro, 1993).

Dentre as espécies herbáceas de Asteraceae nativas do cerrado encontra-se *Vernonia herbacea*, que apresenta um órgão subterrâneo espessado de estrutura caulinar, denominado rizóforo, que armazena até 90% do seu peso seco em frutanos do tipo inulina. Os rizóforos são órgãos altamente ramificados e também atuam como órgãos de

reprodução vegetativa para a planta, por possuírem um grande número de gemas distribuídas em toda a sua superfície (Carvalho & Dietrich, 1993). Como o rizóforo apresenta crescimento geotrópico positivo, o ápice do órgão é a região mais distante da superfície do solo (região distal), e apresenta os tecidos mais jovens. A região oposta, mais próxima à superfície do solo (região proximal), é constituída por tecidos mais velhos. Em geral, as gemas localizadas na região proximal dão origem a ramos aéreos enquanto aquelas da região distal dão origem a ramificações do próprio órgão subterrâneo.

Plantas de *V. herbacea* apresentam um padrão bem definido de desenvolvimento sazonal, que envolve um período de dormência durante o inverno, quando os ramos aéreos sofrem senescência e desaparecem. Este período é marcado por um aumento significativo no conteúdo de frutanos nos rizóforos. Entre agosto e setembro ocorre a brotação dos ramos aéreos, seguida por um período de rápido crescimento da parte aérea, do verão até o início do outono, quando o conteúdo de frutanos aumenta novamente; a floração ocorre logo após a brotação. No fim do inverno, com a quebra da dormência, outras gemas brotam do rizóforo, completando-se um ciclo anual de desenvolvimento da planta (Carvalho & Dietrich, 1993). Essas autoras observaram o declínio do conteúdo de frutanos entre a brotação e a floração, indicando a mobilização dos mesmos para suprir a demanda energética da planta durante o crescimento da parte aérea e desenvolvimento floral após a fase de dormência. As variações quantitativas dos frutanos são seguidas de variações no grau de polimerização das cadeias (Carvalho *et al.*, 1997).

As alterações no conteúdo e na composição de frutanos em *V. herbacea* são acompanhadas por variações nas atividades das

enzimas relacionadas com o metabolismo de frutanos, conforme demonstrado por Portes *et al.* (2002). A síntese de frutanos apresentou aumento na fase vegetativa, quando as plantas apresentavam inflorescências e ramos aéreos desenvolvidos, e a degradação foi mais elevada na fase de brotação, na primavera.

Análises preliminares revelaram a existência de um gradiente de concentração de frutanos que aumentou no sentido do ápice (região distal) para a base (região proximal) dos rizóforos. Adicionalmente, a rebrota dos ramos após a dormência ou após a excisão dos ramos existentes, se dá pelo desenvolvimento das gemas próximas à região basal do rizóforo.

O tamanho médio das moléculas de frutanos pode variar de acordo com a espécie. Condições ambientais e o ciclo fenológico também podem interferir no tamanho das moléculas à medida que estes fatores interferem no acúmulo ou na utilização dos frutanos (Pollock & Chatterton, 1988).

Os frutanos são, depois do amido e da sacarose, os carboidratos de maior ocorrência entre as plantas (Hendry & Wallace, 1993). A separação dos frutanos por cromatografia demonstra que estes compostos são polímeros de frutose polidispersos que apresentam tamanhos e estruturas variáveis (Pollock & Cairns, 1991). Os frutanos são encontrados na forma de séries homólogas de oligo- e polissacarídeos de frutose não redutores, que se originam da sacarose, alongando-se em geral linearmente. Embora a sacarose seja sintetizada no citoplasma, os frutanos são armazenados e sintetizados no vacúolo pela ação de frutossiltransferases (Vijn & Smeekens, 1999).

A distribuição geográfica das famílias que contém frutanos em regiões semiáridas ou temperadas e as relações filogenéticas das ordens nas quais os frutanos são encontrados, sugerem que os frutanos surgiram pelo menos em duas ocasiões e evoluíram em resposta a um evento climático importante que, segundo Hendry (1993) seria a sazonalidade e a redução do fator água no ambiente. Dados paleoclimáticos, analisados frente à expansão da flora de frutanos, dão suporte à essa hipótese (Hendry & Wallace, 1993).

A variação sazonal é uma característica básica do clima e da vegetação do cerrado (Oliveira, 1998). O clima do cerrado é caracterizado pela presença de uma estação seca e fria bem definida, que pode durar até seis meses (Eiten, 1972). A vegetação herbácea e subarborescente do cerrado sobrevive à estação seca de inverno passando por um período de dormência, no qual a parte aérea das plantas senesce (Rawitcher, 1948; Mantovani & Martins, 1988).

Mantovani & Martins (1988) investigaram a fenologia de plantas vasculares em uma área de cerrado e concluíram que o comportamento fenológico da vegetação representa uma série de estratégias adaptativas a estresses térmicos, hídricos e nutricionais.

As espécies vegetais apresentam sensibilidade e respostas variadas a diminuição no potencial de água causada pela seca, baixa temperatura ou salinidade (Kerepesi *et al.*, 1998). Durante a evolução, as plantas desenvolveram diversas estratégias contra os efeitos adversos da seca, entre essas a biossíntese de moléculas que protegem estruturas celulares vitais, especialmente membranas e proteínas (Demel *et al.*, 1998).

Adicionalmente ao papel de compostos de reserva, alguns autores demonstraram o envolvimento dos frutanos na proteção das plantas em situações de seca, salinidade ou baixa temperatura. Por serem compostos altamente solúveis, os frutanos podem promover o ajuste osmótico em situações ambientais adversas pela variação no grau de polimerização de suas moléculas (Pontis & Del Campillo, 1985; Pilon-Smits *et al.*, 1995).

Pilons-Smits *et al.* (1995) verificaram o aumento da tolerância à seca em plantas de tabaco que expressavam frutossiltransferases de origem bacteriana. Mais recentemente foi verificado por Konstatinova *et al.* (2002) o aumento da tolerância ao congelamento nessas mesmas plantas. Estes resultados indicam que a habilidade de sintetizar frutanos confere às plantas maior tolerância a vários tipos de estresses, apesar do mecanismo molecular envolvido neste processo não estar completamente esclarecido (Ritsema & Smeekens, 2003). Alguns autores propuseram que em situações de estresse os frutanos podem prevenir danos à membrana, mantendo a sua integridade e o funcionamento celular (Demel *et al.*, 1998; Vereyken *et al.*, 2001; Hinch *et al.*, 2002).

Na maioria dos trabalhos encontrados na literatura o estudo do metabolismo de frutanos é realizado no órgão subterrâneo de reserva como um todo, desconsiderando as possíveis diferenças existentes nas suas diferentes regiões. Exceções são feitas para o trabalho de Orthen (2001), sobre o conteúdo de carboidratos em três regiões do bulbo de *Lachenalia minima* (Hyacinthaceae), e de Jaime *et al.* (2000), que analisou o conteúdo de fruto-oligossacarídeos e frutanos totais em diferentes tecidos do bulbo de cebola (*Allium cepa*), com o objetivo de

otimizar os procedimentos de extração de fruto-oligossacarídeos (FOS) para sua utilização na indústria alimentícia.

Quando o órgão é analisado por inteiro, detalhes da localização dos processos fisiológicos e bioquímicos são desprezados, podendo ocorrer perda da resolução espacial. Portanto, a localização mais específica desses processos por análises espaciais mais precisas das atividades enzimáticas e do conteúdo de frutanos é importante para melhor compreensão desses processos.

Tendo em vista as variações sazonais no teor e na composição de frutanos em rizóforos de *V. herbacea* e nas atividades das enzimas relacionadas ao seu metabolismo, além das diferenças nos teores de frutanos nas regiões distal, mediana e proximal dos rizóforos, este trabalho teve como objetivos principais a análise espacial do metabolismo de frutanos em rizóforos de plantas de *V. herbacea* em diferentes fases de desenvolvimento e condições fisiológicas. Foram assim analisados os conteúdos e a composição de frutanos e as atividades das enzimas relacionadas ao seu metabolismo em três regiões distintas do rizóforo: a) proximal, referente à região mais próxima de onde ocorre a brotação dos ramos aéreos, b) distal, referente à região apical do órgão, e c) mediana, região compreendida entre essas duas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O cerrado é o segundo maior bioma do Brasil em área. Representa 23% do território brasileiro e é superado apenas pela Floresta Amazônica. Abrange como área contínua os estados de Goiás, Tocantins e o Distrito Federal, parte dos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rondônia e São Paulo e também ocorre em áreas disjuntas ao norte, nos estados do Amapá, Amazonas, Pará e Roraima, e ao sul, em pequenas “ilhas” no Paraná (Ribeiro & Walter, 1998).

O solo apresenta baixos teores de alguns nutrientes, é pobre em bases trocáveis, principalmente cálcio, e possui altas concentrações de alumínio, que impossibilitam a absorção de outros nutrientes pela raiz (Alvim & Araujo, 1952; Goodland, 1971). O clima do cerrado é caracterizado pela presença de uma estação seca e fria bem definida, que pode durar até seis meses (Eiten, 1972). Esta condição permite incluir a maioria dos cerrados, segundo a classificação internacional das savanas, no grupo das savanas tropicais úmidas (Coutinho, 1992).

Savana é definida como um ecossistema tropical caracterizado por forte sazonalidade (geralmente verão úmido e inverno seco) relacionada ao regime hídrico, em que a vegetação consiste de uma cobertura herbácea contínua, com uma significativa, mas descontínua cobertura de arbustos e árvores (Eiten, 1972).

O cerrado é considerado a forma savânica de vegetação com maior biodiversidade no mundo, com uma flora estimada em 3.000 a 7.000 espécies, muitas das quais endêmicas. É, sobretudo um ambiente ameaçado, considerando o ritmo de sua ocupação e transformação dos últimos anos (Mendonça *et al.*, 1998).

A variação sazonal é uma característica do clima e da vegetação do cerrado. Observações sobre o período de floração e troca de folhas das plantas de cerrado e sua associação com as mudanças ambientais foram descritas por Warming (1908) (citado em Oliveira, 1998). De Vuono *et al.* (1986) realizaram um estudo sobre os dados climatológicos da área de cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçu e verificaram que no período de maio a agosto há, naquela região, uma diminuição na quantidade de água no solo. Este período coincide com a diminuição da média de temperatura, com a diminuição do comprimento do dia e da umidade relativa do ar.

Segundo Mantovani (1983), os fatores abióticos (radiação, temperatura, água, fogo, solo, entre outros) juntamente com os fatores bióticos (relações de competição, mutualismo, parasitismo, comensalismo, entre outros) estão relacionados com a fenologia das plantas no cerrado. Esse autor verificou que a maioria das espécies herbáceo-arbustivas mantém um comportamento fenológico relacionado às adaptações reprodutivas.

Estudos fenológicos indicaram diferenças básicas entre o comportamento do estrato herbáceo-subarbusivo e do estrato arbóreo na vegetação. Enquanto plantas herbáceas têm os seus eventos fenológicos ligados à estação chuvosa, as lenhosas parecem ser mais independentes da sazonalidade e muitas delas florescem em

plena estação seca (Sarmiento & Monastério, 1983). Pequenas árvores e arbustos possuem raízes extensas possibilitando que atinjam regiões mais profundas do solo, conseguindo assim água para suprirem suas partes aéreas. As herbáceas e subarborescentes sobrevivem à estação seca de inverno passando por um período de dormência, no qual a parte aérea senesce (Rachid, 1947; Rawitcher, 1948 e Mantovani & Martins, 1988).

O conceito de estratégia fenológica permite entender a diversidade dos eventos fenológicos como formas de otimizar a reprodução e a sobrevivência das espécies. De acordo com este conceito, a fenologia é considerada fruto de um processo ativo de seleção, em que estratégias diferentes de alocação de recursos para as diversas fases do ciclo de vida propiciaram taxas diferentes de sucesso reprodutivo, e não um ajustamento fortuito das plantas às mudanças ambientais (Monastério & Sarmiento, 1976).

Estas alterações sucessivas do meio ambiente impõem muitas restrições ao crescimento e desenvolvimento de plantas vasculares (Corner, 1964). Portanto, é importante que as plantas tenham a capacidade de estocar e translocar parte do carbono fixado na fotossíntese para suprir órgãos heterotróficos durante períodos em que não ocorre fixação de carbono.

Normalmente, essa necessidade é atendida pela síntese de amido como reserva e sacarose para transporte (Preiss & Levi, 1980; Giaquinta, 1980). No entanto, os vegetais superiores empregam diferentes estratégias para explorar ambientes específicos, entre elas, variações nas formas de carbono fixado para reserva e translocação na planta. Algumas espécies, por exemplo, armazenam parte do

carbono fixado na forma de frutanos, que são compostos relacionados tanto estruturalmente quanto metabolicamente à sacarose. Uma das vantagens do armazenamento de frutanos, como composto de reserva, em relação ao de amido são as características físicas e localização celular deste carboidrato. Os frutanos são armazenados no vacúolo na forma solúvel e o amido é armazenado nos plastídeos na forma de cristais insolúveis (Wiemken *et al.* 1995).

Os frutanos são, depois do amido e da sacarose, os carboidratos de maior ocorrência entre as plantas, ocorrendo em aproximadamente 15% das angiospermas (Hendry & Wallace, 1993). Dentre as espécies que armazenam frutanos encontram-se muitas de importância econômica significativa, tais como cereais (cevada, trigo, aveia e centeio), vegetais (alcachofra, aspargos, chicória, alface e cebola), ornamentais (dália e tulipa) e gramíneas forrageiras (*Lolium* e *Festuca*) (Hendry & Wallace, 1993).

Os frutanos são polímeros de frutose lineares ou ramificados originados a partir da sacarose (Hendry & Wallace, 1993). Esses polímeros de D-frutose carregam um resíduo de D-glucose geralmente localizado na extremidade da cadeia, unido por uma ligação do tipo α -1,2 como na sacarose (Kandler & Hopf, 1980). Sendo assim, o frutano mais simples é um monofrutosil sacarose. São conhecidos três isômeros desse trissacarídeo, que diferem entre si pela ligação da frutose a um dos grupos hidroxila da sacarose. O trissacarídeo que dá origem à série da inulina é a 1-cestose ou 1-cestotriose (1-F-frutosil sacarose, α -glu-1,2- β -fru-1,2-fru). A 1-cestose é encontrada em todas as espécies que acumulam frutanos, mesmo naquelas onde a série predominante apresenta outro tipo de ligação entre os resíduos de frutose e foi o primeiro trissacarídeo a ser caracterizado por Bell e

colaboradores (Pollock *et al.* 1996 e referências ali contidas). A 6-cestose ou 6-cestotriose (6-F-frutosilsacarose), que dá origem à série dos levanos, apresenta o resíduo terminal de frutose ligado ao carbono 6 da frutose formando α -glu-1,2- β -fru-6,2-fru, e a neocestose ou 6-G-cestotriose (6-G-frutosilsacarose) apresenta os dois resíduos de frutose ligados à glucose (β -fru-2,6- α -glu-1,2-fru).

Portanto, os frutanos são classificados com base no tipo de ligação glicosídica predominante entre os resíduos de frutose da cadeia, β -2,1 ou β -2,6, sendo que ambas ligações podem ser encontradas na mesma molécula (Pollock *et al.*, 1996). Essencialmente, cinco tipos de frutanos estruturalmente diferentes podem ser distinguidos em plantas superiores: inulina, levano, levano misto, neoserie de inulina e neoserie de levano (Figura 1). O frutano tipo inulina é um polímero de frutose que apresenta principalmente ou exclusivamente ligação β -2,1 frutossil-frutose, enquanto o frutano tipo levano é constituído principalmente ou exclusivamente de ligações β -2,6 frutossil-frutose. Estes dois tipos de frutanos são moléculas lineares, contudo um baixo grau de ramificação pode ocorrer por ligações β -2,6 (no caso da inulina) ou β -2,1 (nos levanos). Os frutanos do tipo inulina são comumente encontrados em Asterales (*Helianthus tuberosus*, *Cichorium intybus*, *Taraxacum officinale* e *Cynara scolymus*), enquanto os do tipo levano são comumente encontrados em Poales (*Phleum*, *Dactylis glomerata*). Contudo, muitas espécies de Poales (*Bromus*, *Triticum*) armazenam frutanos do tipo misto, do qual a bifurcose é um representante. Esse tipo de frutano apresenta ligações mistas, dos tipos β -2,1 e β -2,6, cadeias ramificadas e um resíduo de glucose na extremidade da cadeia. Frutanos em que a molécula de glucose está no interior da cadeia de frutose, são

Figura 1 – Exemplos de diferentes tipos de frutanos. (A) inulina, (B) neoserie de inulina, (C) levano e (D) levano misto. A molécula de sacarose está circulada. Retirado de Ritsema & Smeekens (2003)

baseados em neocestose. A neoserie de inulina, baseada no trissacarídeo neocestose, que ocorre em Liliaceae, apresenta ligações β -2,1 e a neoserie de levano, presente em alguns membros de Poaceae (*Avena*), ligações β -2,6 entre os resíduos de frutose da cadeia principal (Van Laere & Van den Ende, 2002).

Um modelo para a biossíntese de inulina em tubérculos de *Helianthus tuberosus* foi proposto por Edelman & Jefford em 1968. Segundo este modelo, os frutanos são sintetizados pela ação de duas frutossiltransferases. A primeira é a SST (sacarose : sacarose 1 - frutossiltransferase) que catalisa irreversivelmente a formação de 1-cestose a partir de duas moléculas de sacarose, liberando uma de glucose que, após fosforilação, é novamente utilizada na síntese de sacarose. Esta enzima apresenta alta especificidade pela sacarose.

A outra frutossiltransferase é a FFT (frutano : frutano 1- frutossiltransferase), responsável pelo alongamento da cadeia de frutanos, que catalisa a transferência reversível de resíduos terminais de frutose de uma molécula doadora para uma receptora. Nesta reação a menor molécula receptora é a sacarose que, no entanto, nunca pode ser doadora. A FFT também atua na redistribuição das unidades de frutose podendo promover a diminuição do comprimento das cadeias (Edelman & Jefford, 1968). Esse modelo foi confirmado

por estudos de Koops & Jonker (1996) e Lüscher *et al.* (1996) para *Helianthus tuberosus* e por Van den Ende & Van Laere (1996a) para *Cichorium intybus*.

n = nº. de resíduos de frutose extra-sacarose da molécula doadora

m = nº desses resíduos da molécula receptora

A variação na estrutura e no grau de polimerização das cadeias de frutanos das diferentes espécies e nos diferentes tecidos pode ser atribuída principalmente a diferenças nas frutossiltransferases (Hellwege *et al.*, 2000; Pavis *et al.*, 2001; Vergauwen *et al.*, 2003).

A degradação das moléculas de frutanos é catalisada por frutano-exohidrolases (FEH) e ocorre pela remoção sequencial dos resíduos terminais de frutose da cadeia. Os produtos finais da FEH são frutose e sacarose, sendo a enzima fortemente inibida por este dissacarídeo (Edelman & Jefford, 1968; Van den Ende *et al.*, 2003a). A FEH não atua sobre a ligação glicosídica da sacarose.

Duas FEHs principais podem ser reconhecidas, a 1-FEH, que quebra a ligação β -2,1 da inulina e a 6-FEH que atua sobre a ligação β -2,6 dos levanos (Van den Ende *et al.*, 2002)

Segundo a árvore filogenética das frutossiltransferases, frutano-exohidrolases e invertases em mono e dicotiledôneas, as frutossiltransferases evoluíram de invertases vacuolares, enquanto frutano-exohidrolases estão mais relacionadas a invertases de parede celular (Ritsema & Smeekens, 2003).

Os frutanos são acumulados durante o crescimento e desenvolvimento das plantas, contudo, alterações em sua concentração e composição podem estar associadas a variações sazonais de temperatura e outros fatores ambientais (Pollock, 1986; Pontis, 1989; Housley & Pollock, 1993), indicando que, além do papel como carboidrato de reserva, os frutanos apresentam outras funções fisiológicas.

O aumento na concentração de frutanos sugere um aumento das atividades das enzimas de síntese. A SST é induzida por condições que elevam a concentração de sacarose, conseqüentemente de frutanos, entre essas: anoxia (Albrecht *et al.*, 1993), baixa temperatura (Jeong & Housley, 1990; Prud'homme *et al.*, 1993), alta concentração de CO₂ (Smart *et al.*, 1994), iluminação contínua de folhas (Simmen *et al.*, 1993; Penson & Cairns, 1994), alta irradiância (Cairns *et al.*, 2000), seca (De Roover *et al.*, 2000) e deficiência de nitrogênio (Améziane *et al.*, 1997; Wang, 2000).

Um aumento da atividade da FEH nos órgãos subterrâneos de reserva, acompanhado pela diminuição no conteúdo de frutanos, foi observada durante a brotação de órgãos aéreos de várias espécies de

Asteraceae, como *Taraxacum officinale* (Rutherford & Deacon, 1974), *Cichorium intybus* (Van den Ende & Van Laere 1996b), *Helianthus tuberosus* (Marx *et al.*, 1997a) e *Vernonia herbacea* (Ribeiro-Sobrinho *et al.*, 1996; Portes *et al.*, 2002) durante o ciclo normal de desenvolvimento.

Além do aumento de atividade demonstrado em plantas durante a brotação, a atividade da FEH pode ser induzida por baixas temperaturas, conforme verificado em *C. intybus* (Van den Ende & Van Laere, 1996b), e por desfoliação, conforme demonstrado em *Polymnia sonchifolia* (Fukai *et al.*, 1997), *C. intybus* (De Roover *et al.*, 1999), *Lolium perenne* (Marx *et al.*, 1997b; Morvan *et al.*, 1997, Pavis *et al.*, 1998) e *Vernonia herbacea* (Asega & Carvalho, 2004), entre outras.

Estudos realizados por Van den Ende *et al.* (2000a; 2001) revelaram que a desfoliação e a baixa temperatura induzem isoformas diferentes da FEH de *Cichorium intybus*. Esses autores verificaram que a indução da FEHI depende principalmente do tratamento a baixa temperatura, enquanto a FEHII é induzida pelo frio e por desfoliação.

Variações nas atividades das enzimas de síntese também podem ser verificadas em plantas desfoliadas. De Roover *et al.* (1999) demonstrou em plantas jovens de *C. intybus* desfoliadas que, além do aumento da atividade da FEH, ocorreu diminuição da atividade da SST quinze dias após a excisão dos órgãos aéreos e aumento da atividade da FFT a partir do décimo dia.

Pelo fato das alterações nas atividades da FEH e da SST ocorrem sempre em sentidos opostos, alguns autores sugeriram que os genes

que codificam estas enzimas são regulados pelo mesmo efector, porém no sentido oposto (De Roover *et al.*, 1999).

Foram obtidos consideráveis progressos na compreensão do metabolismo de frutanos nos últimos anos, notavelmente pelos estudos de síntese *in vitro*, purificação enzimática, clonagem de genes e transgenese (Cairns, 2003). Além disso, a clonagem e a expressão heteróloga dos genes que codificam as enzimas de síntese possibilitam novas oportunidades biotecnológicas para o uso dos frutanos (Vijn & Smeekens, 1999).

A primeira enzima envolvida na biossíntese dos frutanos a ser clonada foi a 6-SFT de *Hordeum vulgare* (Sprenger *et al.*, 1995). Após isso, outras enzimas foram clonadas, entre elas a 6G-FFT de *Allium cepa* (Vijn *et al.*, 1997), 1-SST de *Cynara scolymus* (Hellwege *et al.*, 1997), de *C. intybus* (De Halleux & Van Cutsem, 1997), de *A. cepa* (Vijn *et al.*, 1998), de *T. officinale* (Van den Ende *et al.*, 2000b), de *Festuca arundinacea* (Lüscher *et al.*, 2000) e de *Helianthus tuberosus* (Van der Meer *et al.*, 1998), e a 1-FFT de *C. scolymus* (Hellwege *et al.*, 1998) e de *H. tuberosus* (Van der Meer *et al.*, 1998).

Dentre as FEHs, já foram clonadas até o presente aquelas específicas para ligações β -2,1, de *Cichorium intybus* (Van den Ende *et al.*, 2000a; Van den Ende *et al.*, 2001) e *Triticum aestivum* (Van den Ende *et al.*, 2003a). Foram clonadas duas isoformas (I e II) da FEH de *C. intybus*, que são induzidas por condições que estimulam a degradação dos frutanos, baixa temperatura e desfoliação (Van den Ende *et al.*, 2000a; Van den Ende *et al.*, 2001).

A detecção de uma atividade elevada da FEH na completa ausência de frutanos em folhas de *C. intybus* estioladas sugeriu uma

função alternativa para esta enzima (Van den Ende *et al.*, 2001). Estes resultados inspiraram os autores a investigar a atividade da FEH em plantas não acumuladoras de frutanos. Embora a completa ausência de FEHs em plantas não acumuladoras de frutanos tenha sido considerada como trivial por muito tempo, uma baixa atividade da FEH foi detectada em algumas dessas plantas (Van den Ende *et al.*, 2000a). Dentre essas, a maior atividade da FEH foi encontrada em *Beta vulgaris*, na qual esta enzima é altamente específica para frutanos com ligações do tipo β -2,6. Diferentemente das FEHs de plantas acumuladoras, a 6-FEH de *B. vulgaris* é fracamente inibida pela sacarose, e a medida da atividade enzimática sugere uma expressão constitutiva em tecidos fonte (Van den Ende *et al.*, 2003b).

O papel das FEHs em plantas não acumuladoras de frutanos ainda não está claro. Entretanto, em analogia a quitinases e β -glucanases que hidrolizam componentes da superfície celular de fungos patógenos de plantas (Burketová *et al.*, 2003), é provável que as 6-FEH de plantas que não armazenam frutanos, atuem na hidrólise de levanos de bactérias endofíticas ou fitopatogênicas tais como *Pseudomonas* ou *Erwinia* (Hettwer *et al.*, 1995; Bereswill *et al.*, 1997), desempenhando um papel de defesa, conforme proposto por Van den Ende *et al.* (2004).

Os frutanos são armazenados quando a produção de fotoassimilados excede a demanda, e são mobilizados quando há necessidade de energia (Ritsema & Smeekens, 2003). Em tecidos fotossintéticos, os frutanos armazenados no vacúolo servem como uma reserva de sacarose, prevenindo a inibição da fotossíntese induzida por açúcares. Em tecidos dreno, a polimerização da sacarose em frutanos é importante para a manutenção do gradiente de

sacarose entre os tecidos de armazenamento e o floema, garantindo sua translocação para esses tecidos (Pollock, 1986). O papel dos frutanos na expansão de flores de *Hemerocallis* e *Campanula rapunculoides* foi sugerido por Bialeski (1993) e Vergauwen *et al.* (2000) respectivamente, que verificaram que os fruto-oligossacarídeos oriundos da despolimerização dos frutanos contribuem para o processo de osmorregulação envolvido na abertura das flores.

A presença de frutanos em Asteraceae foi documentada para regiões temperadas, cuja vegetação exhibe padrões de crescimento sazonal (Pollard & Amuti, 1981), e também para uma área tropical restrita do cerrado brasileiro (Figueiredo-Ribeiro *et al.*, 1986 & Tertuliano & Figueiredo-Ribeiro, 1993). Dentre as Asteraceae herbáceas que compõem a vegetação do cerrado da Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu encontra-se *Vernonia herbacea*, que apresenta um órgão subterrâneo espessado de estrutura caulinar, denominado rizóforo. O rizóforo atua como órgão de reserva para a planta, armazenando até 90% do seu peso seco em frutanos do tipo inulina (Carvalho & Dietrich, 1993). Rizóforos de *Vernonia herbacea* são órgãos altamente ramificados e também atuam como órgãos de reprodução vegetativa, por possuírem um grande número de gemas distribuídas por toda a sua superfície (Carvalho & Dietrich, 1993). Em geral, as gemas localizadas na região do rizóforo mais próxima à zona de inserção do caule (região proximal) dão origem aos ramos aéreos, enquanto aquelas localizadas próximas ao ápice do rizóforo (região distal) dão origem a ramificações do rizóforo (M. A. M. Carvalho, comunicação pessoal).

V. herbacea apresenta um padrão bem definido de desenvolvimento sazonal, que envolve um período de dormência

durante o inverno, quando os ramos aéreos senescem e a planta fica restrita aos órgãos subterrâneos. No início da primavera, ocorre a brotação de novos ramos aéreos a partir de gemas subterrâneas presentes nos rizóforos, seguida pela floração e por um período de crescimento da parte aérea, que continua no verão até o início do outono (Carvalho & Dietrich, 1993).

Uma das estratégias empregadas pelas plantas para sobreviver à seca e ao frio é a síntese de compostos protetores, que podem atuar na estabilização de membranas e proteínas ou promovendo o ajuste osmótico. Dentre estes compostos protetores encontram-se proteínas e carboidratos solúveis (Hoekstra *et al.*, 2001).

A ocorrência do metabolismo de frutanos em espécies de cerrado parece, portanto, estar de acordo com a hipótese sobre o papel desses compostos na regulação osmótica da célula, pois conforme Brocklebank & Hendry (1989), os frutanos permitiriam não apenas a sobrevivência da planta, mas até o seu crescimento em condições de baixa temperatura e disponibilidade de água, características do período de inverno no cerrado.

O papel protetor dos frutanos em situações de estresse tem sido amplamente descrito e, pelo fato das membranas serem o alvo celular primário de injúria em condições de frio e seca (Crowe *et al.*, 1992; Oliver *et al.*, 2001), muitos autores sugeriram que o papel dos frutanos na tolerância ao estresse envolva a estabilização das membranas celulares sob tais condições (Demel *et al.*, 1998). Dessa forma, a presença desses carboidratos conferiria às plantas um mecanismo de tolerância ao estresse (Warren, 1998).

Levantada esta hipótese, muitos experimentos *in vitro* revelaram o papel dos frutanos na proteção de bicamadas lipídicas. Além de atuarem como solutos compatíveis, diminuindo o potencial osmótico da célula, foi relatado que os frutanos interagem diretamente com os fosfolipídeos da membrana, alterando a dinâmica e organização molecular dos lipídeos (Demel *et al.*, 1998). Desta forma, atuariam protegendo as camadas lipídicas, impedindo os lipídeos de passarem do estado líquido-cristalino (L_α) para gel (L_β) (Vereyken *et al.*, 2001). Durante o frio e a seca, a transição dos lipídeos para o estado de gel é responsável pela perda da viabilidade celular devido ao aumento na permeabilidade e, conseqüente perda da função de barreira seletiva das membranas biológicas (Demel *et al.*, 1998; Hinch *et al.*, 2000).

Em muitas espécies, os frutanos são acumulados ou sofrem modificações no tamanho de suas cadeias durante a aclimação ao frio e à seca (Livingston & Henson, 1998; De Roover *et al.*, 2000). Uma evidência adicional para o papel dos frutanos na tolerância das plantas ao estresse é o fato de que plantas transgênicas de tabaco, que passaram a acumular baixas concentrações de levanos, foram significativamente mais tolerantes à seca quando comparadas com plantas selvagens (Pilon-Smits *et al.*, 1995).

O acúmulo de fruto-oligossacarídeos foi correlacionado com a exposição de plantas a baixas temperaturas (Eagles, 1967; Wiemken *et al.*, 1986; Pollock & Chatterton, 1988). Confirmando esta hipótese está o fato de que muitas gramíneas, incluindo cereais, passam a acumular frutanos durante o inverno (Meier & Reid, 1982; Pontis & Del Campillo, 1985; Pollock, 1986; Chatterton *et al.*, 1989; Prud'homme *et al.*, 1993).

Plantas capazes de sintetizar frutanos estão presentes em muitas famílias não-relacionadas filogeneticamente, sugerindo a origem polifilética do metabolismo de frutanos (Hendry, 1993). Esta diversidade de distribuição filogenética e geográfica, juntamente com a ocorrência de frutanos entre famílias consideradas altamente evoluídas, indica que os genes necessários ao metabolismo de frutanos em angiospermas podem ter surgido em resposta a uma ou várias pressões de seleção em um passado relativamente recente (Hendry, 1987). A disponibilidade de água pode ter sido a pressão de seleção que direcionou a evolução do metabolismo de frutanos nas plantas (Pilon-Smits *et al.*, 1995).

Além das funções biológicas descritas acima, os frutanos possuem aplicação medicinal e na indústria alimentícia. A inulina é utilizada na fabricação de xaropes de frutose e como aditivos alimentares e suplementos de dieta. Benéfico às pessoas com problemas de constipação, os fruto-oligossacarídeos (FOS) não são digeridos pelo organismo humano, mas são fermentados no ceco e cólon por bactérias benéficas ao organismo, em particular pelas bifidobactérias, cujo crescimento é estimulado. Os produtos dessa fermentação, em especial os ácidos graxos de cadeias curtas favorecem a diminuição da pressão arterial, da glicemia e dos níveis de colesterol e triglicérides. Os fruto-oligossacarídeos atuam também na prevenção do câncer de cólon (Incoll & Bonnett, 1996, Kang & Kim, 1999; Nguyen *et al.*, 1999; Iizuka *et al.*, 2000). Em comparação com a sacarose, a frutose é duas vezes mais doce, é menos cariogênica, possui maior solubilidade em água e menor viscosidade. Além disso, níveis baixos desse açúcar podem ser metabolizados sem a

necessidade de insulina, o que a torna um adoçante alternativo para diabéticos (Kosaric, 1984; Blakely *et al.*, 1995).

Os concentrados de frutose são tradicionalmente produzidos a partir da hidrólise do amido em três etapas enzimáticas sucessivas que envolvem alfa-amilase, amiloglucosidase e glucose isomerase, ou a partir da hidrólise da sacarose pela invertase, obtendo-se uma mistura final de glucose e frutose, na qual o teor de frutose representa aproximadamente 50% (Manzoni & Cavazzoni, 1992; Godfrey & West, 1996). Uma via interessante para a produção de concentrados de frutose de alta pureza é a hidrólise química ou enzimática da inulina e, ambos processos podem ser utilizados para a produção de concentrados de frutose com fins comerciais, embora a hidrólise química da inulina, além de ser mais dispendiosa, provoca degradações e produção de sub-produtos indesejáveis. Alternativamente, a hidrólise enzimática da inulina, além de não apresentar esses inconvenientes, produz concentrados com até 95% de pureza em uma única etapa enzimática (Nakamura *et al.*, 1995). Além disso, as inulinases de microrganismos são enzimas termoestáveis, com ótimo de temperatura ao redor de 50°C, característica que torna vantajosa a utilização das inulinases na produção de concentrados de frutose a partir da inulina, uma vez que altas temperaturas aumentam a solubilidade desse carboidrato, além de impedir a contaminação microbiana (Pandey *et al.*, 1999).

A inulina também é utilizada em testes de função renal, sendo considerada a substância ideal para a determinação do ritmo de filtração glomerular (Aires, 1991). No Brasil, a inulina comercial utilizada para este fim é importada e de custo elevado, o que invalida seu uso rotineiro. Estudos realizados por Dias-Tagliacozzo *et al.*

(1996), demonstraram a aplicabilidade da inulina extraída de *V. herbacea* para este fim. Estudos sobre nutrição mineral, adubação e produção de inulina em cultivos de *V. herbacea* indicaram que essa espécie do cerrado é uma alternativa para a produção comercial de inulina (Teixeira *et al.* 1997; Carvalho *et al.* 1998; Cuzzuol *et al.*, 2003).

As pesquisas realizadas com *V. herbacea* indicam o seu potencial como fonte produtora de frutanos e sugerem o seu cultivo, visando a preservação de recursos naturais e o uso sustentável de áreas de cerrado (Carvalho & Figueiredo-Ribeiro, 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

Foram utilizados rizóforos de plantas adultas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby cultivadas em vasos individuais mantidos próximos aos canteiros da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica de São Paulo. Após a coleta, os rizóforos foram lavados em água corrente e fragmentados. Amostras das regiões distal, mediana e proximal deste órgão (Figura 2) foram retiradas, pesadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer a -80°C para posterior realização das análises bioquímicas. As amostras foram submetidas à extração enzimática e de frutanos em triplicata, sendo cada repetição correspondente a uma planta.

Figura 2 – Aspecto geral da planta adulta de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby em fase vegetativa que ilustra o padrão de fragmentação do rizóforo em regiões

3.1.1 Conteúdo e composição de frutanos e atividade de SST, FFT, FEH e Invertase nas regiões proximal, mediana e distal dos rizóforos de *Vernonia herbacea* em diferentes fases de desenvolvimento

Foram coletados rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* nas fases de brotação, mês de agosto (primavera), vegetativa, mês de janeiro (verão), e na dormência, mês de agosto (inverno). Foram analisadas também, plantas induzidas à brotação pela excisão dos ramos aéreos, conforme Asega & Carvalho (2004). Para essa indução, plantas na fase vegetativa foram submetidas à remoção dos órgãos aéreos e mantidas por 21 dias em condições ambientais naturais até que as novas brotações atingissem aproximadamente 5 cm de altura. Este tempo foi determinado segundo resultados obtidos por Asega & Carvalho (2004) que mostram que, aos 21 dias, as plantas submetidas à remoção dos órgãos aéreos encontram-se em brotação e apresentam alterações no metabolismo de frutanos características da fase. Decorrido este período os rizóforos de tais plantas foram preparados para realização das extrações enzimáticas e de frutanos, conforme descrito anteriormente. Para fins de comparação, no mesmo dia foram também coletados rizóforos de plantas que permaneciam na fase vegetativa (Vegetativa II), com a parte aérea desenvolvida e intacta. A denominação das amostras e a fase fenológica correspondente a cada um destes pontos de amostragem estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Estações do ano e fases fenológicas correspondentes às amostras analisadas

AMOSTRAS/FASES FENOLÓGICAS	ESTAÇÃO DO ANO
Brotação Natural	primavera
Vegetativo I	verão
Brotação Induzida	verão
Vegetativo II	verão
Dormência	inverno

3.1.2 Conteúdo e composição de frutanos e atividade de SST, FFT, FEH e Invertase nas regiões proximal, mediana e distal dos rizóforos de *Vernonia herbacea* induzidas à brotação pela remoção dos ramos aéreos e submetidas à baixa temperatura

Para a realização deste experimento foi utilizado um lote de plantas na fase vegetativa, o qual foi submetido a três tratamentos: 1) indução à brotação pela remoção dos ramos aéreos (Brotação Induzida); 2) remoção dos ramos aéreos e manutenção das plantas a 5°C, no escuro (Excisão/5°C) e 3) manutenção de plantas intactas a 5°C, no escuro (Intactas/5°C). Para fins de comparação, foram analisadas plantas na fase vegetativa (controle). Após 21 dias de tratamento, os rizóforos foram coletados e submetidos às análises bioquímicas.

A remoção dos órgãos aéreos das plantas foi realizada com o objetivo de induzir a brotação de novos ramos aéreos e, assim, a mobilização de frutanos (Asega & Carvalho, 2004). Parte desse lote de plantas foi mantido a 5°C com a finalidade de verificar a brotação sob tais condições e o comportamento dos frutanos nos rizóforos das plantas sob tais condições.

3.2 Extração de carboidratos solúveis (frutanos)

As amostras liofilizadas correspondentes às três regiões do rizóforo foram maceradas e pesadas para determinação da massa da matéria seca e, então, submetidas à extração de carboidratos conforme Carvalho *et al.* (1998).

As amostras foram colocadas em etanol 80% e mantidas em banho-maria a 80°C por 15 min., após os quais foram centrifugadas a 1080 *g* a temperatura ambiente; o sobrenadante foi reservado e o precipitado re-extraído duas vezes em etanol. Os sobrenadantes etanólicos foram reunidos e reservados e o resíduo final foi extraído duas vezes em água, em banho-maria 60°C por 30 min. e filtrados a vácuo em tecido de algodão. Os sobrenadantes etanólicos e os filtrados aquosos foram reunidos e concentrados em evaporador rotatório, constituindo o extrato bruto de frutanos totais. A seguir, foram submetidos à precipitação com três volumes de etanol para separação da fração de fruto-oligossacarídeos (sobrenadante) e fruto-polissacarídeos (precipitado) após centrifugação a 2900 *g* por 10 min. a 5°C. O precipitado foi ressuspenso em água destilada e o

sobrenadante foi novamente concentrado em evaporador rotatório para eliminação do etanol, sendo o volume ajustado com água destilada.

3.3 Análise quantitativa dos frutanos

O conteúdo de frutose livre e ligada foi determinado nas frações de fruto-oligo e –polissacarídeos e no extrato bruto de frutanos (frutanos totais), através do método de antrona modificado por Jermyn (1956) para cetoses, utilizando-se frutose (Sigma) ($200 \mu\text{g ml}^{-1}$) como padrão.

3.4 Análise qualitativa dos frutanos

3.4.1 Cromatografia de troca aniônica de alta resolução (HPAEC/PAD)

A fração de fruto-oligossacarídeos e os frutanos totais presentes nos extratos brutos foram submetidas à deionização em colunas de troca iônica ($10 \times 1 \text{ cm}$), contendo resinas nas formas catiônica (Dowex 50 x 40 x 200) e aniônica (Dowex 1 x 8 x 200) segundo Carvalho e Dietrich (1993). Os fruto-oligossacarídeos e frutanos totais neutralizados foram submetidos à análise qualitativa de seus componentes por cromatografia de troca aniônica de alta resolução

com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema Dionex modelo DX-300, utilizando-se coluna Carbo Pac PA-1 (4 x 250mm) e coluna Carbo Pac PA-100 (4 x 250 mm) respectivamente, nas concentrações de $400 \mu\text{g ml}^{-1}$ e 4 mg ml^{-1} . A eluição dos carboidratos presentes nas amostras de fruto-oligossacarídeos foi feita utilizando-se um gradiente da mistura do eluente A (150mM de hidróxido de sódio) e eluente B (500mM de acetato de sódio em 150mM de hidróxido de sódio) com a seguinte programação: 0 - 2 min, 25 mM; 2,1 - 8 min, 50 mM; 8,1 - 28 min, 350 mM; 28,1 - 30 min, 500 mM; 30,1 - 35 min, 25 mM. A eluição dos carboidratos presentes nas amostras de frutanos totais foi feita utilizando-se um gradiente da mistura do eluente A (150mM de hidróxido de sódio) e eluente B (500mM de acetato de sódio em 150mM de hidróxido de sódio) com a seguinte programação: 0 - 4 min, 25 mM; 4 - 20 min, 225 mM; 20 - 35 min, 450mM; 35 - 36 min, 500 mM; 36 - 41 min, 25 mM. Para ambos os programas, os potenciais aplicados ao PAD para E1 (480ms), E2 (180 ms) e E3 (360 ms) foram 0,05, 0,75 e -0,20, respectivamente. O fluxo aplicado foi de 1 ml min^{-1} .

3.4.2 Cromatografia de filtração em gel (GPC)

Para a determinação do grau de polimerização médio dos frutanos presentes na fração de fruto-polissacarídeos, as amostras foram dialisadas por uma noite em água corrente. Alíquotas de 0,5 ml, contendo aproximadamente 5 mg de frutose total foram aplicadas em coluna (1,4 X 48cm) de gel de poliacrilamida (Biogel P-10) com

limite de exclusão de 10.000 daltons e fluxo de aproximadamente $0,25 \text{ ml min}^{-1}$, como descrito por Carvalho *et al.* (1997). A coluna foi previamente calibrada com uma série de dextranos lineares de pesos moleculares conhecidos, que proporcionaram a estimativa do grau de polimerização médio das amostras (Andrews, 1965; Praznik & Beck, 1985). Frações de 2 ml foram coletadas por eluição com tampão bicarbonato de amônio 10 mM, contendo 0,002% de azida sódica. O conteúdo de frutose total das frações obtidas foi estimado pelo método de antrona modificado (Jermyn, 1956).

3.5 Extração enzimática

Os rizóforos foram macerados em nitrogênio líquido e homogeneizados em tampão citrato fosfato (Mc Ilvaine) 50mM, pH 5,5, contendo 2mM de EDTA, 5mM de ácido ascórbico, 2mM de β -mercaptoetanol e 10% de polivinilpolipirrolidona (PVPP) na proporção de 1:3 (w/v). O homogeneizado foi filtrado em nylon duplo e ao filtrado foi adicionado sulfato de amônio a 20% de saturação, sendo esta mistura mantida em repouso por uma noite. Após centrifugação a 12.000 *g* por 20 min., o precipitado foi descartado e, ao sobrenadante, foi adicionado sulfato de amônio a 80% de saturação. A mistura foi mantida em repouso por 1 hora, seguindo uma centrifugação a 17.400 *g* por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, constituído principalmente por proteínas, foi ressuspensionado em tampão de extração na proporção de 10 gramas de massa fresca ml^{-1} e submetido à dessalinização em colunas de Bio Gel P-6 DG, obtendo-se

assim os extratos enzimáticos brutos. Toda a manipulação do material durante a extração enzimática foi realizada a 5°C.

3.6 Ensaio enzimático

As misturas de incubação foram constituídas de extrato enzimático e substratos na proporção de 1:1 (v/v). Os substratos utilizados foram sacarose 0,4M para a medida da atividade da SST, 1-cestose 0,4M para FFT, inulina de *Helianthus tuberosus* 100 mg ml⁻¹ (Sigma) para FEH e sacarose 0,2M para invertase. As incubações foram realizadas a 30°C e em diferentes tempos foram retiradas alíquotas das misturas de incubação, que foram submetidas à fervura por 5 min. para a interrupção da reação.

3.7 Análise das atividades enzimáticas

As atividades enzimáticas foram determinadas após 6 horas de incubação para SST, 2 horas para FFT e 4 horas para invertase e FEH. As análises dos produtos de incubação da SST, FFT e invertase foram feitas por HPAEC/PAD e, para realização destas análises, as misturas de incubação foram diluídas cem vezes. A determinação das atividades da SST e FFT foi feita através da eluição dos carboidratos, utilizando-se um gradiente da mistura do eluente A (150mM de hidróxido de sódio) e eluente B (500mM de acetato de sódio em 150mM de

hidróxido de sódio) com a seguinte programação: 0 - 2 min, 25 mM; 2,1 – 8 min, 50 mM; 8,1 – 10 min, 350 mM; 10,1 – 12 min, 500 mM; 12,1 – 17 min, 25 mM. A quantificação foi realizada pela medida das áreas dos picos referentes ao trissacarídeo 1-cestose (SST) e ao tetrassacarídeo nistose (FFT), utilizando-se padrões externos. Para a determinação da atividade da invertase, a eluição dos carboidratos foi feita utilizando-se um programa isocrático de 100mM de hidróxido de sódio e a quantificação foi obtida através da medida da área do pico referente à frutose, utilizando-se padrão externo.

A atividade da FEH foi determinada pela quantidade de frutose liberada na mistura de incubação, através da quantificação do açúcar redutor pelo método colorimétrico de Somogyi (1945), utilizando-se frutose como padrão. A análise qualitativa dos produtos de incubação da FEH foi feita por HPAEC/PAD em sistema já descrito anteriormente, utilizando-se um gradiente da mistura do eluente A (150mM de hidróxido de sódio) e eluente B (500mM de acetato de sódio em 150mM de hidróxido de sódio) com a programação descrita acima para análise dos frutanos; para essa análise as misturas de incubação foram diluídas 50 vezes.

Para todos os métodos utilizados, os potenciais aplicados ao PAD para E1 (480ms), E2 (180 ms) e E3 (360 ms) foram 0,05, 0,75 e -0,20, respectivamente e o fluxo aplicado foi de 1 ml min⁻¹.

3.8 Quantificação de proteínas

O conteúdo de proteína nos extratos enzimáticos foi estimado pelo método de Bradford (1976) com o reagente da Bio Rad, utilizando-se albumina de soro bovino (Sigma) (1 mg ml^{-1}) como padrão.

3.9 Análise dos dados

Os experimentos foram realizados em três replicatas, cada uma correspondente a uma planta. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a média dos valores comparadas pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). A análise multivariada de componentes principais (PCA) foi usada para avaliar a relação dos parâmetros analisados nos diferentes estágios de desenvolvimento da plantas, nas três regiões do rizóforo estudadas. A PCA é uma técnica de redução de dimensionalidade linear, que identifica direções ortogonais de variância máxima nos dados originais, e projeta os dados em um espaço de baixa dimensionalidade, formado por um sub-grupo de componentes de maior variância (Manly, 1994). No presente trabalho um espaço de duas dimensões (dois componentes principais), limitado por dois eixos denominados pc1 e pc2, foi apropriado para esta análise. Foi utilizado o software PC-ORD versão 3.12 (MJM Software Design, Gleneden Beach, Oregon, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Conteúdo e composição de frutanos e atividade de SST, FFT, FEH e Invertase nas regiões proximal, mediana e distal dos rizóforos de *Vernonia herbacea* em diferentes fases de desenvolvimento

A atividade da SST, nas diferentes fases fenológicas e regiões do rizóforo estudadas, é apresentada na Figura 3A. Esta enzima praticamente não apresentou atividade nas fases de Brotação Natural e Dormência em qualquer das regiões do rizóforo analisadas. Entretanto, em ambas as fases vegetativas, mas especialmente na Vegetativa I, avaliada aproximadamente 20 dias antes da Vegetativa II, a atividade da SST foi elevada e, comparando-se as três regiões, esta foi superior na região distal do rizóforo, diminuindo gradualmente no sentido proximal do órgão. A ocorrência de atividade da SST em uma fase em que os órgãos aéreos fotossintetizantes se encontram bem estabelecidos é esperada, uma vez que nestas condições, os fotoassimilados produzidos em excesso à demanda de utilização pela planta, são translocados para o órgão subterrâneo de reserva, ativando a síntese de frutanos.

Figura 3 – Atividade da SST (A), FFT (B), Invertase (C) e FEH (D) nas regiões distal, mediana e proximal de rizóforos de *Vernonia herbacea* em diferentes fases de desenvolvimento. Atividade determinada após 6 horas de incubação para SST, 2 horas para FFT e 4 horas para Invertase e FEH. Os dados representam médias de três repetições ($n=3$) e as letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$ pelo teste Duncan) entre as regiões do rizóforo

SST

Figura 4 – Atividade da SST. HPAEC/PAD dos produtos formados após 6 horas de incubação dos extratos enzimáticos das regiões distal, mediana e proximal de rizóforos de *Vernonia herbacea*, em diferentes fases de desenvolvimento, com sacarose 0,4M. G-glucose, F-frutose, Sac-sacarose, 1-C-1-cestose, N-nistose

Figura 5 – Atividade da FFT. HPAEC/PAD dos produtos formados após 2 horas de incubação dos extratos enzimáticos das regiões distal, mediana e proximal de rizóforos de *Vernonia herbacea*, em diferentes fases de desenvolvimento, com 1-cestose 0,4M. G-glucose, F-frutose, Sac-sacarose, 1-C-1-cestose, N-nistose, 5-oligofrutanos com GP 5

Invertase

Figura 6 – Atividade da Invertase. HPAEC/PAD dos produtos formados após 4 horas de incubação dos extratos enzimáticos das regiões distal, mediana e proximal de rizóforos de *Vernonia herbacea*, em diferentes fases de desenvolvimento, com sacarose 0,2M. G-glucose, F-frutose, Sac-sacarose, 1-C-1-cestose

Figura 7 – Atividade da FFT. HPAEC/PAD dos produtos formados após 4 horas de incubação dos extratos enzimáticos das regiões distal, mediana e proximal de rizóforos de *Vernonia herbácea*, em diferentes fases de desenvolvimento, com inulina de *Helianthus tuberosus* (100 mg ml^{-1}). F-frutose, Fr-frutanos com GP maior que 4

A diminuição da atividade da SST na fase Vegetativa II, em relação à Vegetativa I, sugere que, com o avanço do período vegetativo no ciclo sazonal, a biossíntese de frutanos tende a diminuir progressivamente até a fase de dormência.

Em plantas induzidas à brotação pela remoção dos órgãos aéreos a SST apresentou redução marcante em sua atividade, em relação à fase Vegetativa I, em todas as regiões do rizóforo, embora com relação à Vegetativa II, essa diminuição foi mais significativa na região distal. Isso ocorreu possivelmente porque com a excisão dos ramos aéreos, a translocação de fotoassimilados para os rizóforos foi interrompida e esses órgãos, que até então atuavam como órgãos dreno, passaram a atuar como órgãos fonte, fornecendo compostos ricos em energia para o restabelecimento dos ramos aéreos.

Os resultados mostraram que, enquanto a atividade da SST é elevada em plantas com órgãos aéreos estabelecidos (fase vegetativa), sua atividade é baixa ou inexistente em plantas em brotação, com ramos jovens, ou em plantas dormentes, sem órgãos aéreos. Os resultados confirmam ainda a importância do fornecimento contínuo de fotoassimilados dos órgãos fonte para os órgãos dreno na biossíntese de frutanos, conforme descrito por Asega & Carvalho (2004).

A atividade da SST encontra-se também ilustrada na Figura 4, que apresenta a análise por HPAEC/PAD dos produtos formados pelos extratos enzimáticos correspondentes às regiões distal, mediana e proximal, nos diferentes estágios de desenvolvimento estudados. Verifica-se que, nas fases de Brotação Natural, Brotação Induzida e Dormência, praticamente não houve síntese de 1-cestose, produto da

ação da SST. Já na fase Vegetativa I, a ocorrência de síntese de frutanos é ilustrada pelo aumento de 1-cestose, sobretudo na região distal dos rizóforos, seguida pela mediana e proximal, conforme o gradiente crescente de atividade da base para a região distal descrito anteriormente (Figura 3A). Verifica-se também o aumento da glucose, que é outro indicador da atividade da SST e da biossíntese de frutanos. Comparando-se a produção de 1-cestose nas duas fases vegetativas, constatou-se que a síntese do trissacarídeo foi menor na fase Vegetativa II.

Semelhantemente ao resultado obtido no presente trabalho, Asega & Carvalho (2004) verificaram uma acentuada diminuição na atividade da SST em rizóforos de plantas de *V. herbacea* em fase de brotação induzida pela excisão dos ramos aéreos. Prud' homme *et al.* (1992) também verificaram uma diminuição na atividade da SST em raízes e estolões de *Lolium perenne* durante os seis dias posteriores a desfoliação, seguida de um aumento progressivo na atividade a partir do 15º dia, quando os tecidos foliares já haviam sido restabelecidos. De Roover *et al.* (1999) detectaram semelhante diminuição na atividade da SST em raízes de plantas de *Cichorium intybus* desfoliadas e Rutherford & Deacon (1974), estudando a variação sazonal do metabolismo de frutanos em raízes de *Taraxacum officinale*, uma outra Asteraceae também armazenadora de frutanos, verificaram que houve atividade da SST durante o ciclo fenológico analisado, contudo esta sofreu significativa diminuição na primavera, durante a brotação. Esses dados foram confirmados por Van den Ende *et al.* (2000b), que analisaram por dois anos consecutivos a atividade das enzimas envolvidas no metabolismo de frutanos em raízes de plantas jovens de *T. officinale*, e constataram que a SST apresentou

atividade elevada na fase vegetativa (pós-floral) nos dois ciclos fenológicos estudados.

Resultados semelhantes foram relatados por Itaya *et al.* (1999) para *Viguiera discolor*, espécie nativa do cerrado com crescimento sazonal definido como o de *V. herbacea*, na qual a atividade da SST aumentou na fase vegetativa, no verão, quando a parte aérea das plantas encontrava-se bem estabelecida.

O perfil de atividade da FFT, enzima que promove a redistribuição dos resíduos de frutose entre cadeias de frutanos de diferentes tamanhos, é apresentado na Figura 3B. A FFT apresentou atividade superior à da SST em todas as fases analisadas. A distribuição da atividade nas regiões do rizóforo foi semelhante à apresentada pela SST nas fases Vegetativa I, Brotação Induzida e Dormência, ou seja, mais elevada na região apical e diminuindo no sentido proximal do rizóforo. Contudo, o mesmo padrão não foi observado nas fases de Brotação Natural e Vegetativa II, nas quais não foram constatadas diferenças significativas entre as regiões distal e proximal do rizóforo. Ocorreu um expressivo aumento na atividade da FFT após o período de brotação natural, na fase Vegetativa I, especialmente na região distal. Entretanto, verificou-se uma significativa diferença no perfil de atividade da FFT nas duas fases vegetativas estudadas. Em plantas induzidas à brotação, a atividade da FFT apresentou aumento significativo na região distal e foi semelhante nas demais regiões do rizóforo, quando comparadas com plantas em fase natural de brotação. A FFT apresentou atividade em todas as fases analisadas, indicando que esta enzima apresenta atividade tanto em fases em que o metabolismo de frutanos está voltado para síntese quanto em fases de mobilização dessas reservas.

A detecção de atividade da FFT na fase de Dormência sugere que neste período a FFT atue diminuindo o tamanho das cadeias de frutanos, de forma a facilitar a ação da FEH na fase de brotação subsequente. A Figura 5 ilustra a atividade da FFT pela análise por HPAEC/PAD, demonstrando aumento do pico referente à nistose.

Rutherford & Deacon (1974), estudando a variação sazonal dos frutanos em raízes de *Taraxacum officinale*, constataram que a atividade da FFT foi sempre superior à da SST, e que não houve variação significativa na atividade da FFT durante o período avaliado. Van den Ende *et al.* (2000b) também analisando a dinâmica sazonal das enzimas do metabolismo de frutanos em raízes de *T. officinale*, verificaram que a atividade da FFT permaneceu praticamente constante durante seu ciclo de crescimento.

A Invertase, enzima responsável pela quebra da sacarose em glucose e frutose, apresentou atividade elevada nas fases de Brotação Induzida e Dormência (Figura 3C), sendo que na primeira esta diminuiu em direção à região proximal do rizóforo. Asega & Carvalho (2004) discutem que em plantas de *V. herbacea* induzidas à brotação pela excisão da parte aérea, o aumento da atividade invertásica antecede o da FEH, e sugerem que a invertase hidrolisaria a sacarose disponível nos rizóforos antes de ocorrer degradação dos frutanos pela FEH. Pelos resultados obtidos neste trabalho, podemos sugerir que em plantas induzidas à brotação, apesar da atividade da invertase ter apresentado um gradiente de atividade inverso ao da FEH, a disponibilidade de sacarose na região distal dos rizóforos nesta fase era maior, favorecendo o aumento da atividade da invertase. A elevada concentração de sacarose na região distal na fase de brotação induzida pode ser observada na Figura 9, que mostra a análise por

HPAEC/PAD da fração de fruto-oligossacarídeos além de glucose, frutose e sacarose *in vivo*. Quando as plantas entram em senescência, parte do carbono alocado na parte aérea é translocado para o órgão subterrâneo das plantas, na forma de sacarose. A elevada atividade de invertase detectada na fase de Dormência indica que parte da sacarose dos rizóforos é hidrolisada e, possivelmente, utilizada na manutenção da atividade metabólica dos rizóforos durante esta fase.

A atividade da Invertase, determinada pela quantificação da frutose liberada, está ilustrada na Figura 6, na qual os perfis cromatográficos dos produtos de incubação são apresentados.

A FEH, enzima responsável pela despolimerização das cadeias de frutanos, apresentou atividade consideravelmente mais elevada na fase de Brotação Induzida nas três regiões do rizóforo (Figura 3D). Detectou-se um gradiente crescente de atividade, no sentido do ápice para a região proximal do rizóforo, inverso ao descrito para a atividade da SST. Nas fases Vegetativa I e Dormência, a atividade da FEH foi muito baixa e na Vegetativa II esta não foi detectada. Na fase de Brotação Natural, a atividade detectada foi muito inferior à Brotação Induzida; entretanto, o padrão de distribuição da atividade nas regiões do rizóforo foi semelhante em ambas as fases. Analisando a atividade da FEH em rizóforos de *V. herbacea* durante o ciclo fenológico de desenvolvimento, Ribeiro Sobrinho *et al.* (1996) demonstraram sua ocorrência apenas na fase de brotação. Um aumento significativo da atividade da FEH foi detectado também em plantas induzidas à brotação pela remoção dos ramos aéreos na fase vegetativa (Asega & Carvalho, 2004). Entretanto, nesses trabalhos, as diferentes regiões dos rizóforos não foram consideradas. A atividade da FEH detectada no presente trabalho pode ser visualizada na Figura 7 que ilustra, pela

análise por HPAEC/PAD dos produtos de incubação dos extratos enzimáticos das diferentes regiões do rizóforo, o aumento da liberação de frutose da região distal para a proximal do rizóforo nas fases de Brotação Natural e Induzida, especialmente na última.

A atividade mais elevada da FEH detectada na região proximal do rizóforo também confirma a hipótese inicial deste trabalho de que a mobilização massiva dos frutanos deva ocorrer próximo à região da qual se originam os novos ramos aéreos durante a brotação. Com relação à baixa atividade encontrada na fase de Brotação Natural, esta se deve possivelmente ao fato da amostragem ter sido realizada anteriormente ao pico máximo de atividade desta enzima, pois, conforme demonstrado por Asega & Carvalho (2004), o período de atividade elevada desta enzima durante a brotação é de aproximadamente uma semana. Embora este resultado tenha sido descrito para plantas de *V. herbacea* induzidas à brotação pela remoção dos ramos aéreos, um comportamento semelhante para a FEH pode ser esperado em condições de brotação natural. Desta forma a data estabelecida para a coleta das plantas pode não ter favorecido a detecção da máxima atividade da FEH na fase de brotação natural.

Os resultados obtidos no presente experimento além de corroborar os resultados descritos anteriormente sobre o aumento da atividade da FEH na brotação (Ribeiro Sobrinho *et al.*, 1996) e, principalmente em plantas induzidas à brotação (Asega & Carvalho, 2004), acrescentam novas informações sobre a localização espacial da atividade enzimática nos rizóforos.

Rutherford & Deacon (1974) em seus experimentos com raízes de *Taraxacum officinale*, também demonstraram um aumento da atividade da FEH na primavera, durante a fase de brotação. Estes autores sugeriram que o aumento poderia, pelo menos em parte, estar relacionado com a redução do conteúdo de frutanos nas raízes verificado nesta fase, considerando que foi observado que os níveis destes compostos voltaram ao normal no final do verão, durante a fase de crescimento vegetativo destas plantas. No entanto, Van den Ende *et al.* (2000b), estudando o metabolismo de frutanos em raízes de plantas jovens desta mesma espécie, relataram que a atividade da FEH permaneceu baixa durante o primeiro ano de crescimento, inclusive na primavera, durante a floração. Os autores sugeriram que a energia necessária para o processo de floração foi fornecida diretamente pelos fotoassimilados das folhas e não pela mobilização de frutanos das raízes.

Já em estudos realizados com *Helianthus tuberosus*, Marx *et al.* (1997a) mostraram que durante os estágios iniciais de desenvolvimento dos tubérculos, a atividade da FEH foi muito baixa e aumentou quando a planta entrou em dormência. No início da fase de dormência, um proeminente aumento na atividade da FEH foi acompanhado por um aumento na concentração de frutose livre e sacarose. Subseqüentemente, a concentração de frutose diminuiu e permaneceu baixa, enquanto a de sacarose manteve-se elevada.

Um grande aumento na atividade da FEH e uma diminuição na concentração de frutanos foram também observados nos órgãos subterrâneos de reserva de yacon, após uma forte ventania que causou danos à parte aérea das plantas (Fukai *et al.* 1997). Estes autores sugeriram que os frutanos são mobilizados para a manutenção

do crescimento quando o fornecimento de fotossintatos é insuficiente durante o período de crescimento. Degasperi *et al.* (2003) também detectaram um aumento na atividade da FEH quando a parte aérea de plantas de *Viguiera discolor* foi removida.

Marx *et al.* (1997b) e Morvan *et al.* (1997) relataram o aumento das atividades hidrolíticas (FEH e invertase) 26 e 48h após a desfoliação em *Lolium perenne*. Pavis *et al.* (1998) também observaram um aumento da atividade da FEH e diminuição em 80% nos níveis de frutanos nas bases das folhas de *L. perenne* após a desfoliação, sendo os frutanos de alto grau de polimerização hidrolisados completamente durante as primeiras seis horas. Estes dados indicam que a atividade da FEH, embora ocorra primariamente durante o período de brotação, pode ser induzida também em diferentes fases fenológicas.

Mino *et al.* (1978) investigaram o efeito da desfoliação em *Phleum pratense*, analisando o efeito da altura da excisão no metabolismo de carboidratos. Estes autores verificaram a indução da FEH quando a parte aérea é removida durante a estação vegetativa, sugerindo que a interrupção da translocação de fotossintatos está relacionada com a indução da atividade da FEH.

Como a sacarose é o principal carboidrato translocado pelas plantas e é o composto que dá origem aos frutanos, sugeriu-se que sua concentração na célula pode controlar a biossíntese e a degradação desses compostos (Chatterton *et al.* 1987). A sacarose pode agir como um indutor da SST (Wagner & Wiemken 1986), enquanto parece ser um forte inibidor da atividade da FEH (Van den Ende *et al.*, 2001). A inibição da atividade da FEH por sacarose já foi

comprovada para diversas espécies, como *Helianthus tuberosus* (Edelman & Jefford, 1964), *Cichorium intybus* (Claessens *et al.*, 1990; Van den Ende *et al.*, 2001), *Lolium temulentum* (Simpson *et al.*, 1991), *Lolium rigidum* (Bonett & Simpson, 1993) e *Triticum aestivum* (Van den Ende *et al.*, 2003a). Os resultados descritos por Asega & Carvalho (2004) e os obtidos neste trabalho sugerem que a atividade da FEH em rizóforos de *V. herbacea* também seja inibida por sacarose, uma vez que na fase vegetativa, na qual a atividade da SST é mais elevada possivelmente em decorrência de um aumento da translocação desse fotoassimilado para os rizóforos, a atividade da FEH é baixa ou inexistente (Figura 3D). Portanto, os resultados obtidos neste trabalho também reforçam a hipótese do controle temporal das enzimas do metabolismo de frutanos que estão presentes no mesmo compartimento celular, o vacúolo, proposta por Frehner *et al.* (1984).

O conteúdo de proteínas totais foi determinado nos extratos enzimáticos brutos, e não apresentou variações significativas entre as regiões do rizóforo analisadas. Os valores variaram de 100 a 200 μg de proteína g^{-1}mf nas diferentes fases de desenvolvimento estudadas. Assim, os cálculos de atividades enzimáticas levaram em consideração a atividade total das enzimas com base na massa fresca do tecido.

A concentração de fruto-polissacarídeos foi, em geral, superior à de fruto-oligossacarídeos (Figura 8), como já havia sido mostrado por Carvalho & Dietrich (1993) e Asega & Carvalho (2004).

O conteúdo de fruto-oligossacarídeos apresentou algumas diferenças entre as regiões do rizóforo nas fases analisadas, mas, em

Figura 8 – Conteúdo de fruto-oligossacarídeos (A), fruto-polissacarídeos (B) e frutanos totais (C) nas regiões distal, mediana e proximal em rizóforos de *Vernonia herbacea* em diferentes fases de desenvolvimento. Os dados representam médias de três repetições ($n = 3$) e as letras comparam as três regiões do rizóforo em cada fase ($p < 0,05$ pelo teste Duncan)

geral, foi mais elevado na região distal e diminuiu em direção à região proximal dos rizóforos (Figura 8A).

Os cromatogramas gerados pela análise por HPAEC/PAD da fração de fruto-oligossacarídeos mostraram a presença de todos os membros da série homóloga de frutanos com grau de polimerização de 3 a 25, além da glucose, frutose e sacarose, em todas as regiões e fases de desenvolvimento estudadas (Figura 9). A análise permitiu também a visualização de algumas variações na proporção dos componentes desta fração.

Na Brotação Natural, embora não tenham sido detectadas diferenças quantitativas significativas na atividade da FEH entre as regiões, a proporção de frutose e sacarose nas regiões proximal e mediana foi maior que na distal (Figura 9), sugerindo maior atividade hidrolítica nestas regiões. Na Brotação Induzida verificou-se um aumento mais pronunciado na proporção de frutose na região proximal. Este resultado confirma não apenas a atividade mais elevada da FEH, na região proximal, detectada *in vitro* na fase de Brotação Induzida, como também mais elevada em relação à fase de Brotação Natural.

A variação no conteúdo de fruto-polissacarídeos entre as regiões do rizóforo (Figura 8B), não apresentou o mesmo padrão observado para os oligossacarídeos. Diferenças significativas entre as três regiões do rizóforo foram detectadas apenas nas fases Vegetativa I e II. Nessas, os teores foram mais elevados na região mediana. Considerando o rizóforo como um todo, os conteúdos mais elevados de fruto-polissacarídeos foram detectados na Dormência e os mais baixos na Brotação Induzida.

Figura 9 – HPAEC/PAD dos fruto-oligossacarídeos nas regiões distal, mediana e proximal de rizóforos de *Vernonia herbacea*, em diferentes fases de desenvolvimento. G-glucose, F-frutose, Sac-sacarose, 1-C-1-kestose, Fr>4- frutanos com GP maior que 4 (oligofructanos)

Carvalho & Dietrich (1993) também detectaram em plantas dessa mesma espécie um aumento no teor de frutanos na Dormência e na fase Vegetativa e uma queda nas fases de brotação e floração, acompanhada de um aumento de frutose livre, sugerindo a ocorrência da hidrólise de frutanos associada ao crescimento dos novos ramos e o desenvolvimento floral. Mais recentemente, Asega & Carvalho, (2004) verificaram que o conteúdo de fruto-oligo e –polissacarídeos em rizóforos de *V. herbacea* induzidas à brotação pela excisão dos ramos aéreos diminuiu progressivamente até o 13º após a excisão, coincidindo com o início da brotação de novos ramos e com a diminuição da atividade da SST. Portanto, a concentração elevada de frutanos totais verificada nos rizóforos de plantas na fase de Brotação Natural pode ser mais um indício de que a atividade da FEH detectada nesta fase não representou o pico de atividade desta enzima na fase de brotação e sim um estágio anterior ao pico, conforme mencionado anteriormente. Além disso, na fase seguinte, Vegetativa I, a concentração de frutanos foi mais baixa, sugerindo que estes já haviam sofrido degradação pela FEH.

O conteúdo de frutano total (Figura 8C) variou de aproximadamente 300 a 800 mg de frutose g⁻¹ms e, as concentrações mais elevadas foram detectadas nas fases de Brotação Natural, Vegetativa II e Dormência.

A Figura 10 mostra o perfil cromatográfico por HPAEC/PAD dos frutanos totais nas regiões distal, mediana e proximal dos rizóforos. Foram verificadas algumas diferenças na proporção dos componentes de cada amostra.

Frutano Total

Figura 10 - HPAEC/PAD dos extratos bruto de frutanos nas regiões distal, mediana e proximal de rizóforos de *Vernonia herbacea* em diferentes fases de desenvolvimento. Fr>4–frutanos com GP maior que 4

Em geral, a proporção de frutanos de cadeias mais curtas foi maior nas regiões distais (Figura 10). Este resultado condiz com a atividade da SST predominante na região distal, particularmente nas fases Vegetativa I e II (Figura 3A).

A Tabela 2 apresenta o grau de polimerização (GP) e a massa molecular relativa (MMr) dos frutanos presentes na fração de fruto-polissacarídeos obtidos por cromatografia de filtração em gel. Em geral, os menores valores de GP foram detectados na região distal (GP médio 45), seguida da mediana (GP médio 54) e proximal (GP médio 69). Os menores valores de MMr e GP detectados na região distal sugerem que nesta região dos rizóforos em que os tecidos são mais jovens, as cadeias de frutanos ainda não atingiram o grau de polimerização máximo característico da espécie. Da mesma maneira, o comprimento médio das cadeias encontrado na região proximal foi maior, condizente com a idade do tecido. Diferenças entre o GP dos frutanos de tecidos mais jovens e mais velhos foram detectadas por Carvalho *et al.* (1997).

Estudando o conteúdo e a composição de frutanos em plantas de *V. herbacea* regeneradas a partir de fragmentos de rizóforos, esses autores verificaram que o GP dos fruto-polissacarídeos das novas ramificações dos rizóforos foi geralmente inferior à encontrada no fragmento inicial de rizóforo. Enquanto nos fragmentos iniciais o GP variou de 31, no primeiro mês após o plantio, a 45 no sexto mês após o plantio, nos novos rizóforos o GP variou de 27, seis meses após o plantio, a 36 quinze meses após o plantio dos fragmentos iniciais.

Tabela 2. Grau de polimerização (GP) e massa molecular relativa (MMr) dos frutanos presentes na fração de fruto-polissacarídeos das regiões distal, mediana e proximal dos rizóforos de *Vernonia herbacea* em diferentes fases de desenvolvimento, obtidos por cromatografia de filtração em gel em coluna BioGel P10

Fase Fenológica	Região do rizóforo					
	Distal		Mediana		Proximal	
	GP	MMr (Da)	GP	MMr (Da)	GP	MMr (Da)
Brotação natural	44	7,2	56	9,1	56	9,1
Vegetativo I	44	7,2	64	10,3	56	9,1
Brotação induzida	56	9,1	50	8,0	64	10,3
Vegetativo II	34	5,5	56	9,1	56	9,1
Dormência	50	8,0	44	7,1	64	10,3
Médias	45,7	7,4	53,9	8,7	59,1	9,6

Os menores valores de grau de polimerização encontrados na região distal (Tabela 2), são condizentes com a maior proporção de frutanos de cadeias curtas, mostrados na Figura 10, e parecem estar associados com a atividade de biossíntese de frutanos mais elevada nessa região (Figura 3A).

Embora nas fases de Brotação Natural e, especialmente, na Brotação Induzida as plantas tenham apresentado atividade da FEH mais elevada, sobretudo na região proximal do rizóforo, não foi constatada uma diminuição no GP médio das moléculas. Este

resultado sugere um mecanismo de ação da FEH do tipo “single chain”, pelo qual a enzima degrada as cadeias de frutanos preferencialmente até a molécula de sacarose. Desta forma, o GP das moléculas remanescentes não diminuiu por não terem sofrido ação da FEH.

O mecanismo “single chain”, segundo Simpson & Bonnett (1993) implica na hidrólise completa de cada polímero até que a sacarose, antes da enzima se ligar à outra molécula de substrato, e foi assim denominado em oposição ao mecanismo de hidrólise do tipo “multi chain”, que implica na liberação do polímero de frutano após a clivagem de cada frutose terminal.

O tipo de mecanismo de ação das FEHs foi estudado em *Cichorium intybus* (Claessens *et al.*, 1990) e *Dactylis glomerata* (Yamamoto & Mino, 1987) e, para ambas foi verificado que somente frutose foi liberada dos frutanos como produto da atividade enzimática, evidenciando o mecanismo de hidrólise do tipo “multi chain” para estas espécies. Embora em *V. herbacea* a frutose seja o principal produto da atividade da FEH, a manutenção de frutanos com cadeias longas na região proximal do rizóforo (Tabela 2), mesmo durante a mobilização destas reservas no período de brotação, sugere um mecanismo do tipo “single chain” para a FEH desta espécie.

Além disso, a maior proporção de frutanos com alto GP na região proximal dos rizóforos em fases em que a atividade da FEH é elevada, sugere que a FEH de *V. herbacea* teria maior afinidade por moléculas com GP menor e, portanto estas seriam as primeiras a serem mobilizadas na fase de brotação. Isto pode ter favorecido a detecção

das cadeias maiores em maior proporção na região proximal dos rizóforos.

Portanto, esses resultados indicam que o comprimento médio das cadeias de frutanos está relacionado não apenas com a idade do tecido nos rizóforos, mas também com as atividades das enzimas de biossíntese e de degradação de frutanos.

No presente trabalho, as atividades das enzimas do metabolismo de frutanos detectadas *in vitro* mostraram diferenças, em geral significativas, nas três regiões do rizóforo analisadas e coerentes com a fase de desenvolvimento em que as plantas se encontravam. Entretanto, essas diferenças nem sempre puderam ser relacionadas com os teores de frutanos que, por sua vez apresentaram pequenas diferenças entre as regiões e nas diferentes fases de desenvolvimento. Essa dificuldade ocorre em razão dos teores elevados de frutanos no órgão de reserva e devido também às diferenças nas escalas de detecção das atividades enzimáticas e conteúdo de frutanos.

A despeito desses fatores, os resultados obtidos nesse trabalho possibilitaram algumas deduções a respeito do mecanismo de ação das enzimas envolvidas no metabolismo de frutanos, e um maior conhecimento sobre a dinâmica do metabolismo destes carboidratos nos rizóforos em diferentes fases de desenvolvimento das plantas.

Os resultados obtidos nesse experimento foram submetidos a análise de componentes principais (PCA) (Figura 11), que mostrou uma clara separação entre a região proximal na fase de Brotação Induzida (BI PROX), a região distal na fase Vegetativa I (VEGI DIST) e os demais componentes analisados, avaliando a distribuição pelo primeiro componente principal (pc1), que contribuiu para 39,3% da

Figura 11 – Distribuição das regiões do rizóforo nas diferentes fases de desenvolvimento analisados pelo primeiro e segundo componente principal (eixo pc1 e pc2, respectivamente). BN DIST= Brotação Natural-região distal, BN MED= Brotação Natural-região mediana, BN PROX= Brotação Natural-região proximal, VEGI DIST= Vegetativo I-região distal, VEGI MED= Vegetativo I-região mediana, VEGI PROX= Vegetativo I-região proximal, BI DIST= Brotação Induzida-região distal, BI MED= Brotação Induzida-região mediana, BI PROX= Brotação Induzida-região proximal, VEGII DIST= Vegetativo II-região distal, VEGII MED= Vegetativo II-região mediana, VEGII PROX= Vegetativo II-região proximal, DORM DIST= Dormência-região distal, DORM MED= Dormência-região mediana e DORM PROX= Dormência-região proximal

variância total dos dados, e pc2, que contribuiu com 24,94%. Os parâmetros fisiológicos que tiveram maior significância na separação das regiões do rizóforos nas diferentes fases de desenvolvimento, em relação ao eixo pc1, foram: fruto-polissacarídeos, SST e frutano total, em ordem decrescente de importância. Por outro lado, os parâmetros fisiológicos mais significantes na separação dos pontos em relação ao eixo pc2 foram: fruto-oligossacarídeos, FEH e FFT. Os resultados obtidos na PCA confirmam a hipótese inicial do presente trabalho de que a síntese de frutanos ocorre preferencialmente na fase vegetativa e em tecidos mais jovens (região distal), onde foi detectada atividade mais elevada da SST, enquanto a sua despolimerização acontece preferencialmente na fase de brotação e na região mais próxima àquela que origina os novos ramos aéreos (região proximal), onde a atividade da FEH foi mais elevada. Além disso, os resultados apresentados demonstraram pela primeira vez a distribuição espacial das atividades das enzimas de síntese e degradação de frutanos em um órgão subterrâneo de reserva, e permitiram a associação dessas variações aos processos fisiológicos que ocorrem nas diferentes fases de desenvolvimento da planta.

4.2 Conteúdo e composição de frutanos e atividade de SST, FFT, FEH e Invertase nas regiões proximal, mediana e distal dos rizóforos de *Vernonia herbacea* induzidas à brotação pela remoção dos ramos aéreos e submetidas à baixa temperatura

A atividade da SST nas regiões distal, mediana e apical do rizóforo de plantas sob os diferentes tratamentos é apresentada na Figura 12A. Em plantas na fase vegetativa, e aqui consideradas como plantas controle, esta enzima apresentou o mesmo gradiente crescente de atividade, no sentido proximal-distal, verificado anteriormente para esta fase fenológica (experimento I). Este resultado indica que a síntese de frutanos na fase vegetativa ocorre principalmente na região distal dos rizóforos. Em plantas induzidas à brotação pela remoção dos órgãos aéreos (Brotação Induzida) a atividade da SST diminuiu consideravelmente, porém foi mais elevada na região distal. Em plantas com a parte aérea intacta e mantidas a 5°C por 21 dias (Intactas/5°C), a SST apresentou atividade inferior, porém com um gradiente semelhante ao da fase vegetativa, embora a atividade desta enzima tenha sido inibida pelo frio. Nas plantas excisadas e submetidas a 5°C, a atividade da SST não foi detectada em qualquer das regiões do rizóforo. A atividade da SST está ilustrada na Figura 13, que apresenta a análise por HPAEC/PAD dos produtos de incubação dos extratos enzimáticos correspondentes às regiões distal, mediana e proximal, nos diferentes tratamentos. Na fase vegetativa, a concentração de 1-cestose, principal produto de ação da SST, é elevada, principalmente na região distal, onde a atividade da SST foi mais acentuada. Em plantas induzidas à brotação (Brotação

Figura 12 – Atividade da SST (A), FFT (B), Invertase (C) e FEH (D) nas regiões distal, mediana e proximal dos rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* no estágio Vegetativo, submetidas à remoção da parte aérea (Brotação Induzida), intactas e mantidas sob baixa temperatura (Intactas/5°C) e submetidas à remoção da parte aérea e baixa temperatura (Excisadas/5°C). Atividade determinada após 6 horas de incubação para SST, 2 horas para FFT e 4 horas para Invertase e FEH. Os dados representam médias de três repetições (n=3) e as letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$ pelo teste Duncan) entre as regiões do rizóforo

SST

Figura 13 - Atividade da SST. HPAEC/PAD dos produtos formados após 6 horas de incubação dos extratos enzimáticos das regiões distal, mediana e proximal de rizóforos de *Vernonia herbacea*, com sacarose 0,4M. G–glucose, F–frutose, Sac–sacarose, 1-C–1-cestose, N–nistose

Figura 14 - Atividade da FFT. HPAEC/PAD dos produtos formados após 2 horas de incubação dos extratos enzimáticos das regiões distal, mediana e proximal de rizóforos de *Vernonia herbacea*, com 1-cestose 0,4M. G-glucose, F-frutose, Sac-sacarose, 1-C-1-cestose, N-nistose, 5-oligofrutanos com GP 5, 6-oligofrutanos com GP 6

Figura 15 - Atividade da Invertase. HPAEC/PAD dos produtos formados após 4 horas de incubação dos extratos enzimáticos das regiões distal, mediana e proximal de rizóforos de *Vernonia herbacea*, com sacarose 0,2M. G–glucose, F–frutose, Sac–sacarose, 1-C–1-cestose

Figura 16 - Atividade da FEH. HPAEC/PAD dos produtos formados após 4 horas de incubação dos extratos enzimáticos das regiões distal, mediana e proximal de rizóforos de *Vernonia herbacea*, com Inulina de *Helianthus tuberosus* 100 mg.ml⁻¹. F-frutose, Fr > 4-frutanos com GP maior que 4

Induzida), uma baixa concentração de 1-cestose foi detectada apenas na região distal dos rizóforos. Já no tratamento Intactas/5°C, a 1-cestose foi detectada em todas as regiões analisadas, contudo foi mais elevada na região distal, ilustrando o gradiente crescente de atividade sentido proximal-distal que esta enzima apresenta. Como mostrado acima (Figura 12A), em plantas do tratamento Excisadas/5°C a atividade de SST foi inibida não havendo, portanto, síntese de 1-cestose.

Asega & Carvalho (2004), estudando o metabolismo de frutanos em rizóforos de *V. herbacea*, verificaram uma diminuição gradual na atividade da SST após a excisão dos ramos aéreos. A diminuição da atividade da SST em plantas desfoliadas foi mostrada por diversos autores para outras espécies. Prud' homme *et al.* (1992) constataram uma diminuição na atividade dessa enzima em raízes e estolões de *Lolium perenne* durante os seis dias posteriores à desfoliação, seguida de um aumento progressivo a partir do 15º dia, quando os tecidos foliares já haviam sido restabelecidos. De Roover *et al.* (1999) detectaram semelhante diminuição na atividade da SST em raízes de plantas jovens de *Cichorium intybus* 24 horas após a desfoliação, seguida de aumento após o quinto dia. Fukai *et al.* (1997) reportaram uma diminuição na atividade da SST em órgãos subterrâneos de *Polymnia sonchifolia*, após uma forte ventania que causou danos à parte aérea das plantas.

A redução da atividade da SST em plantas induzidas à brotação pela remoção dos ramos aéreos se deve, principalmente, à interrupção da translocação de sacarose, substrato para a biossíntese de frutanos, dos órgãos aéreos (órgãos fonte) para os rizóforos (órgãos dreno).

A atividade da FFT é apresentada na Figura 12B. A enzima apresentou atividade em todos os tratamentos e regiões dos rizóforos analisadas. Em plantas na fase vegetativa (controle), nas induzidas à brotação e naquelas submetidas à excisão dos ramos aéreos e à baixa temperatura (Excisadas/5°C), a FFT apresentou um gradiente de atividade semelhante ao da SST, ou seja, atividade mais elevada na região distal, diminuindo no sentido proximal do rizóforo. Este padrão de atividade entre as três regiões não foi observado nas plantas do tratamento Intactas/5°C. A atividade da FFT pode ser visualizada na Figura 14, que mostra a análise por HPAEC/PAD dos produtos formados quando os extratos enzimáticos foram incubados com 1-cestose. Na fase vegetativa ocorreu um aumento gradual da produção de nistose no sentido proximal-distal e síntese de frutanos com GP 5 e 6 na região distal dos rizóforos, o que demonstra uma atividade elevada da FFT nessa região, nessa fase. Como descrito anteriormente, no tratamento Brotação Induzida, praticamente não houve diferença na atividade da FFT nas regiões mediana e proximal, conforme pode ser verificado pela semelhança das áreas dos picos referentes à nistose nos cromatogramas. Já no tratamento Intactas/5°C, o pico correspondente à nistose nas três regiões foi semelhante. Em plantas desprovidas da parte aérea e mantidas no frio (Excisadas/5°C) observou-se o aumento do pico referente à nistose da região proximal para a distal, ilustrando o gradiente de atividade detectado neste sentido.

A atividade da Invertase nas três regiões do rizóforo é apresentada na Figura 12C. Na fase vegetativa a atividade dessa enzima apresentou um gradiente crescente de atividade no sentido proximal-distal, enquanto em plantas submetidas aos tratamentos,

Brotação Induzida, Intactas/5°C e Excisadas/5°C, houve uma tendência ao gradiente de atividade no sentido distal-proximal, com a atividade bem mais elevada na região proximal nas plantas do tratamento Brotação Induzida e Intactas/5°C. O perfil de atividade da Invertase pode ser visualizado na Figura 15 e demonstra que a atividade desta enzima foi muito baixa, como pode ser verificado pelo pico referente à frutose nos cromatogramas apresentados nesta figura para as três regiões analisadas em todos os tratamentos aplicados. A concentração elevada de glucose e 1-cestose na fase vegetativa, no cromatograma correspondente à região distal indicam atividade da SST.

A atividade da FEH foi detectada em todas as regiões e tratamentos avaliados e pode ser observada na Figura 12D. Nos três tratamentos aplicados foi observado um padrão semelhante de distribuição espacial de atividade nas três regiões do rizóforo, que consistiu de um gradiente crescente de atividade no sentido distal-proximal, similar ao resultado mostrado anteriormente para plantas em brotação (experimento I). Contudo, este padrão de distribuição de atividade não foi observado em plantas na fase vegetativa, consideradas como controle. Nessas, as atividades foram semelhantes nas regiões distal e proximal e superiores à detectada na região mediana. Portanto, os tratamentos aplicados promoveram alterações na distribuição espacial da atividade da FEH, especialmente na região proximal do rizóforo. Em plantas intactas mantidas no frio (Intactas/5°C), as taxas de atividade foram semelhantes às das plantas induzidas à brotação. Entretanto, plantas sob esse tratamento não apresentaram rebrota, embora os ramos aéreos tenham sofrido injúria e senescido. Em plantas sem os órgãos aéreos e mantidas no

frio (Excisadas/5°C), a atividade da FEH nas três regiões do rizóforo foi mais elevada do que nos demais tratamentos, apesar do frio ter inibido sua brotação.

A atividade mais elevada da FEH detectada no tratamento Excisadas/5°C em relação ao Brotação Induzida e Intactas/5°C sugere um efeito sinérgico da remoção dos ramos aéreos e do frio sobre a atividade dessa enzima e/ou a ocorrência de mecanismos de regulação diferentes por esses dois fatores de estresse, frio e desfoliação.

Van den Ende *et al.* (2001) verificaram que duas isoformas da FEH (FEH I e FEH II) de *Cichorium intybus* são induzidas sob condições diferentes. Enquanto a FEH I é induzida somente em plantas mantidas sob temperatura baixa, a FEH II é induzida tanto em plantas desfoliadas e induzidas à brotação como em plantas mantidas em baixa temperatura. Esses autores sugeriram que, com a interrupção na translocação de sacarose para as raízes após a retirada abrupta dos órgãos aéreos e, conseqüente mudança desses órgãos de dreno para fonte, a FEH II seja uma enzima de sobrevivência e sua indução pode ocorrer em qualquer estágio fisiológico ou em situações que aumentam a demanda por energia. Baseando-se nesses resultados e, segundo os resultados obtidos para atividade da FEH no presente trabalho, pode-se sugerir que os tratamentos de indução da brotação e de frio induzem isoformas diferentes da FEH em *V. herbacea*.

O aumento da atividade da FEH detectado no tratamento Brotação Induzida está relacionado com o fornecimento de compostos pelos rizóforos (órgãos fonte), necessários ao restabelecimento dos ramos aéreos (órgãos dreno) da planta nesta fase, conforme

mentionado anteriormente (Mino *et al.* 1978; Fukai *et al.* 1997; Marx *et al.* 1997a; Morvan *et al.*, 1997; Pavis *et al.*, 1998; Degasperri *et al.* 2003; Asega & Carvalho, 2004).

O fato das plantas do tratamento Excisadas/5°C e Intactas/5°C terem apresentado aumento da atividade da FEH sem ocorrência de rebrota de ramos aéreos, sugere que os frutanos despolimerizados, não sendo necessários para o crescimento de novos ramos aéreos, tenham sido utilizados em processos que conferem às plantas sobrevivência a baixas temperaturas. Esta hipótese foi sugerida pois, como os frutanos atuam como solutos compatíveis, é possível que a sua despolimerização ocorra para promover a diminuição do potencial osmótico das células e/ou para atuar na proteção da estrutura de moléculas e complexos protéicos, conforme apontado por Warren (1998).

A atividade da FEH pode ser visualizada na Figura 16, que mostra a análise por HPAEC/PAD da frutose liberada quando os extratos enzimáticos foram incubados com inulina de *Helianthus tuberosus*. Pode-se confirmar que, diferentemente do controle, nos três tratamentos estudados a liberação de frutose aumentou no sentido distal-proximal e foi consideravelmente mais elevada no tratamento Excisadas/5°C.

Os conteúdos de fruto-oligo e -polissacarídeos e frutanos totais estão apresentados na Figura 17. Foram detectadas pequenas diferenças nos conteúdos de frutanos totais entre os diferentes tratamentos e entre as diferentes regiões estudadas. Contudo foram verificadas algumas diferenças na proporção das frações de oligo e polissacarídeos que compõem estes extratos. Por exemplo, nos

Figura 17 – Conteúdo de fruto-oligosacarídeos (A), fruto-polissacarídeos (B) e frutanos totais (C) nas regiões distal, mediana e proximal de rizóforos de *Vernonia herbacea* no estágio Vegetativo (controle), submetidas à remoção da parte aérea (Brotação Induzida), intactas e mantidas sob baixa temperatura (Intactas/5°C) e submetidas à remoção da parte aérea e baixa temperatura (Excisão/5°C). Os dados representam médias de três repetições (n=3) e as letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$ pelo teste Duncan) entre as regiões do rizóforo

tratamentos de baixas temperaturas a proporção de fruto-oligo para polissacarídeos foi maior do que nos demais tratamentos, indicando uma maior concentração de oligossacarídeos. Assim, considerando-se o conteúdo total de oligo e polissacarídeos nos rizóforos, sem levar em consideração a distribuição desses compostos nas regiões distal, mediana e proximal, a razão oligossacarídeos:polissacarídeos foi 1,17 em plantas Intactas/5°C e 1,64 em plantas Excisadas/5°C. Já nas plantas induzidas à brotação essa razão foi 0,58 e nas plantas controle (fase Vegetativa) foi 0,84, indicando uma maior concentração de fruto-polissacarídeos. Entretanto, se nessas últimas a razão for calculada com base apenas nos conteúdos da região distal, esta será 1,84 uma vez que nessa região a concentração de oligossacarídeos é bem mais elevada do que a de polissacarídeos. A razão oligo:polissacarídeos maior que 1 nos tratamentos de frio e menor que 1 no Brotação induzida pode ser consequência da atividade de isoformas diferentes de FEHs induzidas sob essas duas condições, conforme discutida acima, e com afinidade e/ou modo de ação diferentes em relação ao substrato.

Possivelmente em plantas dos tratamentos Intactas/5°C e Excisão/5°C a maior proporção de fruto-oligossacarídeos encontrada esteja relacionada com o envolvimento destes compostos na estabilização de complexos protéicos e membranas celulares em situações de estresse. Hinch *et al.*, 2000 verificaram que preparações de inulina com graus de polimerização entre 10 e 30 foram efetivamente protetoras às membranas celulares quando estas foram expostas ao frio. A capacidade de interação dos frutanos com as membranas celulares deprime a temperatura da fase de transição dos lipídeos de líquido-cristalina para gel, conferindo assim a esses

carboidratos um importante papel na proteção das plantas ao frio e seca (Crowe *et al.*, 1996; Tsvetkova *et al.*, 1998; Hinch *et al.*, 2000). Assim, os frutanos desempenhariam papéis fisiológicos precisos nas plantas, além de constituírem uma reserva de energia e osmolitos (Van Laere & Van Den Ende, 2002).

O papel dos frutanos na resistência à seca foi por exemplo, constatado por Pilon-Smits *et al.* (1995) em plantas de tabaco que expressavam frutossiltransferases bacterianas. Em plantas de *Beta vulgaris* também modificadas para a síntese de frutanos, a seca promoveu um significativo aumento no seu crescimento, quando comparadas com o tipo selvagem (Pilon-Smits *et al.*, 1999).

A análise qualitativa por HPAEC/PAD dos fruto-oligossacarídeos, com GP de 3 a aproximadamente 25, é apresentada na Figura 18. Na fase Vegetativa a maior proporção de 1-cestose, nistose e fruto-oligossacarídeos de cadeias mais curtas ($GP \leq 10$) detectada na região distal, indica a ocorrência de síntese mais ativa de frutanos, corroborando com a atividade elevada de SST e FFT (Figura 12A e B), além do maior teor de fruto-oligo ao de polissacarídeos nessa região do rizóforo (Figura 17A e B).

Em plantas cujos órgãos aéreos foram excisados (Brotação Induzida), o pico referente à frutose, principal produto de ação da FEH em *V. herbacea*, aumentou no sentido distal-proximal, e também corroborou com o gradiente de atividade observado para a FEH. Entretanto, nas plantas do tratamento Intactas/5°C e Excisadas/5°C, não se detectou aumento do pico referente à frutose, apesar da atividade *in vitro* da FEH ter sido também elevada nesses tratamentos.

**Fruto
oligossacarídeos**

Figura 18 - HPAEC/PAD dos fruto-oligossacarídeos nas regiões distal, mediana e proximal dos rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* no estágio Vegetativo, submetidas à remoção da parte aérea (Brotção Induzida), intactas e mantidas sob baixa temperatura (Intactas/5°C) e submetidas à remoção da parte aérea e baixa temperatura (Excisadas/5°C). G-glucose, F-frutose, Sac-sacarose, 1-C-1-cestose, Fr > 4–frutanos com GP maior que 4 (oligofrutanos)

Baseando-se nos resultados de atividade da FEH nos tratamentos aplicados às plantas de *V. herbacea* e naqueles obtidos por Van den Ende *et al.* (2001), que indicam que as duas isoformas, I e II, da FEH de *Cichorium intybus* são induzidas por diferentes condições, desfoliação e tratamentos que envolveram baixas temperaturas (Intactas/5°C e Excisadas/5°C) apresentarem maior proporção de fruto-oligossacarídeos e, o tratamento que envolveu a desfoliação das plantas (Brotação Induzida) apresentar maior proporção de fruto-polissacarídeos, pode-se sugerir que estes tratamentos induzem isoformas diferentes de FEH em *V. herbacea*, com afinidades e/ou modo de ação diferentes em relação ao substrato. Estes mecanismos representariam estratégias de sobrevivência que desencadeariam respostas fisiológicas diferentes nas plantas.

O grau de polimerização (GP) e a massa molecular relativa (MMr) dos frutanos presentes na fração de fruto-polissacarídeos foram estimados por cromatografia de filtração em gel (GPC) e são apresentados na Tabela 3. Em todos os tratamentos analisados, a região distal apresentou GP 34, o menor valor de GP encontrado para os rizóforos neste trabalho. Como mencionado anteriormente, possivelmente nos tecidos mais jovens, como é o caso da região distal, as cadeias de frutanos ainda não atingiram o grau de polimerização máximo característico da espécie.

Nas plantas do tratamento Brotação Induzida e Excisadas/5°C, o maior valor de GP foi detectado na região proximal dos rizóforos. Este resultado foi semelhante ao obtido para plantas induzidas à brotação apresentado no experimento anterior e, conforme já discutido, pode estar relacionado à idade do tecido e também ao mecanismo de ação do tipo "single chain" sugerido para a FEH de *V. herbacea*. De acordo

com Simpson & Bonnett (1993), este mecanismo possibilita a despolimerização de cadeias de frutanos inteiras até a molécula de sacarose e, conseqüentemente, a manutenção da integridade das moléculas restantes. Isso explicaria o porque do GP médio das moléculas de frutanos na região proximal, onde a atividade da FEH é mais elevada, ser mais maior.

Tabela 3. Grau de polimerização (GP) e massa molecular relativa (MMr) dos frutanos presentes na fração de fruto-polissacarídeos das regiões distal, mediana e proximal dos rizóforos de *V. herbacea* em fase Vegetativa e submetidas aos tratamentos de: remoção dos órgãos aéreos (Brotação Induzida), plantas intactas e mantidas a 5°C (Intactas/5°C) e remoção dos órgãos aéreos e mantidas a 5°C (Excisadas/5°C)

Fase Fenológica	Região do rizóforo					
	Distal		Mediana		Proximal	
	GP	MMr (kDa)	GP	MMr (kDa)	GP	MMr (kDa)
Vegetativo	34	5,5	50	8,0	39	6,3
Brotação Induzida	34	5,5	50	8,0	56	9,1
Intactas/5°C	34	5,5	50	8,0	44	7,1
Excisadas/5°C	34	5,5	44	7,1	50	8,0

A Figura 19 apresenta a análise por HPAEC/PAD dos frutanos totais, mostrando o perfil cromatográfico de todos os componentes presentes *in vivo*. Como as amostras cromatografadas apresentavam conteúdo equivalente de frutose, o que diferiu entre estas foi a proporção dos componentes que as compõem.

Pela análise de GPC dos fruto-polissacarídeos, como descrito acima, verificou-se que a região distal dos rizóforos em todos os tratamentos aplicados apresentou os menores valores de GP. Da mesma maneira, em HPAEC/PAD, verificou-se o predomínio de frutanos com cadeias menores entre os frutanos totais presentes na região distal em todos os tratamentos (Figura 19). É nítida a diferença na área/altura dos picos quando comparamos, por exemplo, os cromatogramas da região proximal de plantas no Vegetativo (GP 39) e Brotação Induzida (GP 56). Nas primeiras os picos referentes aos componentes de cadeias mais curtas apresentam áreas maiores, indicando sua maior proporção entre os frutanos totais, enquanto nos demais tratamentos estes componentes encontram-se em menor proporção.

Livingston & Henson (1998) constataram que durante a aclimação ao frio em aveia (*Avena sativa*), os níveis de glucose, frutose, sacarose e frutanos, especialmente com GP 3 e 4, aumentaram significativamente e esse aumento foi relacionado com as mudanças na atividade da FEH e invertase no apoplasto. Uma vez que a formação de cristais de gelo inicia-se no apoplasto, os autores sugeriram o papel dos frutanos na proteção ao congelamento. Vágújfalvi *et al.* (1999) estudando o efeito do frio na dinâmica do metabolismo de carboidratos em dois genótipos desta mesma espécie (*Avena sativa*), um sensível e um tolerante ao frio, verificaram que o conteúdo de frutano total aumentou em ambos os genótipos, contudo

Frutano Total

Figura 19 - HPAEC/PAD dos extratos bruto de frutanos nas regiões distal, mediana e proximal dos rizóforos de plantas de *Vernonia herbacea* no estágio Vegetativo, submetidas à remoção da parte aérea (Brotação Induzida), intactas e mantidas sob baixa temperatura (Intactas/5°C) e submetidas à remoção da parte aérea e baixa temperatura (Excisadas/5°C). Fr>4– frutanos com GP maior que 4

o aumento foi maior no tolerante. Os autores sugeriram que as diferenças na tolerância ao frio entre as variedades se devem a diferenças na capacidade de acumular carboidratos sob condições de baixa temperatura. Santoiani *et al.* (1993) também verificaram que a exposição a baixa temperatura resultou no aumento do conteúdo de sacarose e frutanos com GP>3 em raízes de trigo (*Triticum aestivum*). Muitos autores encontraram uma correlação positiva entre o conteúdo de açúcares e o grau de tolerância a estresses abióticos em cereais, sugerindo que um aumento no conteúdo de açúcares aumenta a tolerância (Suzuki, 1989).

Duas espécies de *Bromus* adaptadas a diferentes condições climáticas foram estudadas por Puebla *et al.* (1997) para determinar a resposta das plantas ao frio e a seca. Estes autores verificaram que a espécie adaptada a áreas frias (*B. pictus*) apresenta síntese de frutanos constitutiva, enquanto a espécie adaptada a temperaturas elevadas (*B. auteticus*) somente acumularam frutanos quando exposta a baixa temperatura, sugerindo o papel dos frutanos na tolerância das plantas a estresses ambientais.

Gonzalez *et al.* (1990) investigaram as mudanças no conteúdo e na composição de carboidratos em *Lolium perenne* e verificaram que durante o inverno a concentração de frutanos com alto GP diminuiu e predominaram açúcares osmoticamente ativos (oligofrutanos), sugerindo que os frutanos com alto GP foram hidrolisados, originando carboidratos de baixo GP. Entretanto, estes autores discutiram que o predomínio de carboidratos com baixo GP durante o inverno diminuiu o ponto de congelamento da água em 0,17°C, e que somente a correlação do ajuste osmótico com a alteração no conteúdo de frutanos não é suficiente para conferir tolerância ao frio.

Orthen (2001) demonstrou que em *Lachenalia minima*, uma Hyacinthaceae que acumula quantidades semelhantes de amido e frutanos, a fonte de energia e carbono necessária para brotação provém da degradação do amido e, que os frutanos estão envolvidos nas relações hídricas. Nessas plantas os frutanos com baixo GP foram preferencialmente acumulados nas escamas mais internas do bulbo, direcionando o fluxo de água para as regiões onde a necessidade de água para o crescimento é maior.

Van den Ende & Van Laere (2002) estudaram o efeito dos danos foliares e das baixas temperaturas na indução da FEH em raízes de *Cichorium intybus* no outono, estágio de pré-colheita, e verificaram que somente a desfoliação das plantas não induz com a mesma rapidez as mudanças induzidas pela baixa temperatura no campo na época da colheita, indicando que a baixa temperatura pode ser essencial para a indução da FEH.

Os resultados do presente trabalho foram também submetidos à análise de componentes principais (PCA) (Figura 20). Essa análise indicou que o primeiro componente principal (pc1), contribuiu para 32,1% da variância total dos dados, e o pc2, contribuiu com 28,7%. Os parâmetros fisiológicos mais significantes na separação das regiões do rizóforo nos diferentes tratamentos, em relação ao eixo pc1, foram: fruto-oligossacarídeos, fruto-polissacarídeos e FEH, em ordem decrescente de importância. Contudo, em relação ao eixo pc2, os parâmetros fisiológicos mais significantes foram: SST, FFT e FEH.

A distribuição dos componentes pelos quatro quadrantes mostrou a separação dos pontos referentes às três regiões do rizóforo na fase vegetativa, uma vez que estes ficaram dispostos abaixo do

Figura 20 – Distribuição das regiões do rizóforo na fase vegetativa e nos diferentes tratamentos aplicados pelo primeiro e segundo componente principal (eixo pc1 e pc2, respectivamente). VEG DIST= Vegetativo-região distal, VEG MED= Vegetativo-região mediana, VEG PROX= Vegetativo-região proximal, BI DIST= Brotação Induzida-região distal, BI MED= Brotação Induzida-região mediana, BI PROX= Brotação Induzida-região proximal, I/5°C DIST= Intactas/5°C-região distal, I/5°C MED= Intactas/5°C-região mediana, I/5°C PROX= Intactas/5°C-região proximal, E/5°C DIST= Excisadas/5°C-região distal, E/5°C MED= Excisadas/5°C-região mediana, E/5°C PROX= Excisadas/5°C-região proximal

eixo pc1, nos quadrantes 3 e 4, e que os pontos referentes aos três tratamentos analisados ficaram quase todos dispostos acima do eixo pc1. Estes resultados indicam que existiram diferenças entre as plantas que foram submetidas aos tratamentos e as plantas controle, na fase vegetativa.

Avaliando a distribuição dos pontos referentes aos tratamentos Brotação Induzida, Intactas/5°C, Excisadas/5°C pela projeção destes no eixo pc1, é possível verificar o agrupamento das regiões de cada tratamento analisado, uma vez que estas ficaram próximas. Este resultado sugere que a desfoliação e a baixa temperatura desencadearam mecanismos de respostas diferentes no metabolismo de frutanos. Além disso, considerando que os parâmetros fisiológicos mais significantes na separação dos pontos, em relação ao eixo pc1, foram fruto-oligo, fruto-polissacarídeos e FEH, conclui-se que as respostas fisiológicas das plantas dos três tratamentos envolvem alterações na proporção destes carboidratos e na atividade da FEH, conforme verificado no presente trabalho.

Possivelmente, as plantas do tratamento Brotação Induzida utilizaram o produto da despolimerização das cadeias de frutanos no restabelecimento da parte aérea das plantas, como estratégia de sobrevivência frente à retirada dos órgãos vegetativos. Já as plantas dos tratamentos Intactas/5°C e Excisadas/5°C possivelmente utilizaram o produto da despolimerização das cadeias de frutanos no ajuste osmótico e na proteção de estruturas celulares, como uma estratégia de sobrevivência utilizada por estas plantas em situações de baixa temperatura.

Estresses ambientais induzem um complexo de respostas nas plantas, tanto em nível celular, como fisiológico e de desenvolvimento (Levitt, 1980). Plantas tolerantes ao estresse empregam uma variedade de estratégias para sobreviverem a condições ambientais adversas, incluindo a síntese de compostos protetores, como proteínas específicas e açúcares de baixo peso molecular (Steponkus, 1984; Hinch *et al.*, 1998). Os frutanos são um outro grupo de compostos implicados na tolerância das plantas ao estresse (Pollock & Cairns, 1991; Vijn & Smeekens, 1999). A relação entre o metabolismo de frutanos e o ajuste osmótico não está completamente esclarecida, mas o fato dos principais açúcares encontrados nas plantas (sacarose, frutose e glucose) estarem envolvidos no metabolismo de frutanos pode esclarecer o papel central destes carboidratos nos processos de adaptação a condições de estresse (Vagújfalvi *et al.*, 1999).

5 CONCLUSÕES

✓ O metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea* apresentou variações temporais durante o ciclo fenológico e variações espaciais ao longo do eixo de crescimento dos rizóforos. Alguns padrões de variação foram mantidos, ocorrendo mudanças apenas na intensidade das respostas.

- Na fase vegetativa, quando a planta apresenta os órgãos aéreos desenvolvidos e fotossinteticamente ativos, a biossíntese de frutanos foi mais ativa e ocorreu principalmente na região distal diminuindo em direção à região proximal dos rizóforos, evidenciada pelo gradiente crescente de atividade da SST e FFT no sentido proximal-distal desse órgão.
- A mobilização de frutanos necessários ao restabelecimento da parte aérea na fase de brotação, natural ou induzida pela excisão dos ramos aéreos, ocorreu principalmente na região proximal dos rizóforos, próximo à região de inserção dos novos ramos aéreos, evidenciada pelo gradiente crescente de atividade da FEH no sentido distal-proximal.

✓ Em geral, o conteúdo de fruto-oligossacarídeos nas diferentes fases fenológicas foi mais elevado na região distal e diminuiu em direção à região proximal dos rizóforos.

✓ Os frutanos presentes na região distal, constituída por tecidos mais jovens, apresentaram os menores valores de GP médio, demonstrando que as cadeias de frutanos nos tecidos jovens não apresentam o GP máximo característico da espécie.

✓ O GP médio elevado das cadeias de frutanos detectado na região proximal dos rizóforos nas fases de brotação natural e induzida, em presença de atividade elevada da FEH, sugere um mecanismo de ação da FEH do tipo "single chain".

✓ A indução à brotação pela remoção dos órgãos aéreos e a exposição de plantas intactas ou excisadas a baixa temperatura, levaram à diminuição da atividade da SST, possivelmente, pela interrupção da translocação de sacarose para os rizóforos.

✓ O padrão de distribuição da atividade da FEH nas três regiões do rizóforo foi semelhante nos tratamentos Brotação Induzida, Intactas/5°C e Excisadas/5°C. Contudo, nesse último a atividade foi mais elevada. Estes resultados sugerem que os efeitos da desfoliação e do frio na atividade dessa enzima parecem ser sinérgicos e que, possivelmente, diferentes isoformas da FEH são induzidas por esses dois tipos de estresse, frio e desfoliação.

✓ Tendo em vista o elevado teor de frutanos armazenado nos rizóforos, que dificulta a detecção de alterações em sua concentração, os melhores indicadores das variações temporal e espacial desses carboidratos são as atividades das enzimas envolvidas no seu metabolismo.

✓ Plantas submetidas à baixa temperatura apresentaram diferenças nítidas na proporção de fruto-oligo e polissacarídeos, sendo o conteúdo de oligossacarídeos maior que o de polissacarídeos. Já nas plantas induzidas à brotação, a proporção de fruto-polissacarídeos foi superior a de oligossacarídeos. Este resultado sugere que alterações na proporção de fruto-oligo e -polissacarídeos representam estratégias de sobrevivência diferentes em situações de estresse causados pela desfoliação e baixa temperatura, e que estes carboidratos desempenhariam papéis fisiológicos específicos nas plantas.

✓ A PCA dos resultados obtidos no experimento I confirmou que o metabolismo de frutanos apresenta variações espaciais e temporais, conforme verificado pelo teor e composição dos frutanos e principalmente pelas atividades das enzimas relacionadas ao seu metabolismo. A análise mostrou uma clara separação da região proximal na fase de Brotação Induzida e da região distal na fase Vegetativa I, dos demais pontos analisados. Estes resultados confirmam a hipótese inicial do trabalho de que a despolimerização dos frutanos ocorre preferencialmente na região proximal dos rizóforos, onde a FEH apresentou atividade mais elevada, e que a

biossíntese de frutanos ocorre preferencialmente na região distal dos rizóforos, onde a SST apresentou atividade mais elevada.

✓ A PCA dos resultados obtidos no experimento II confirmou que as respostas das plantas aos três tratamentos analisados, em relação ao metabolismo de frutanos, são diferentes e envolvem alterações na proporção de fruto-oligo e polissacarídeos e na atividade da FEH, uma vez que os parâmetros fisiológicos mais significantes na separação dos pontos foram esses. Os frutanos atuaram tanto como compostos necessários ao restabelecimento da parte aérea, como no ajuste osmótico e proteção de moléculas e estruturas celulares, sujeitas a dano em situações de baixa temperatura. Esses mecanismos resultam em diferentes estratégias que visam a sobrevivência das plantas a condições adversas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES, M.M. Fisiologia renal. In: AIRES, M.M. (Ed.). **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1991. p.495-583.
- ALBRECHT, G.; KAMMERER, S.; PRAZNIK, W.; WIEDENROTH, E.M. Fructan content of wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) under hypoxia and following re-aeration. **New Phytologist**, v.123, p.471-476, 1993.
- ALVIM, P.T.; ARAUJO, W.A. El suelo como factor ecológico en desarrollo de la vegetación en el planalto central de Brasil. **Turrialba**, v.2, p.153-160, 1952.
- AMÉZIANE, R.; DELEENS, E.; NOCTOR, G.; MOROT-GAUDRY, J.; LIMAMI, M. Stage of development is an important determinant in the effect of nitrate on photoassimilate (^{13}C) partitioning in chicory (*Cichorium intybus*). **Journal of Experimental Botany**, v.48, p.25-33, 1997.
- ANDREWS, P. The gel filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. **Biochemical Journal**, v.96, p.595-606, 1965.

- ASEGA, A.F.; CARVALHO M.A.M. Fructan metabolising enzymes in rhizophores of *Vernonia herbacea* upon excision of aerial organs. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.42, p.313-319, 2004.
- BERESWILL, S.; JOCK, S.; ALDRIDGE, P. JANSE, J.D.; GEIDER, K. Molecular characterization of natural *Erwinia amylovora* strains deficient in levan synthesis. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.51, p.215-225, 1997.
- BIELESKI R. Fructan hydrolysis during petal expansion in the ephemeral dailily flower. **Plant Physiology**, v.109, p.557-565, 1993.
- BLAKELY, S.T.; MISLO, B.L.; BASI, N.S.; PAINTER, R.H. Dietary fructose alters the insulin-like effects of dietary vanadate in adipocytes from rats. **Nutrition Research**, v.15, p.25-35, 1995.
- BONNETT, G.D.; SIMPSON, R.J. Fructan-hydrolizing activities from *Lolium rigidum* (Gaudin). **New Phytologist**, v.123, p.443-451, 1993.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BROCKLEBANK, K.J.; HENDRY, G.A.F. Characteristics of plant species which store different types of reserve carbohydrates. **New Phytologist**, v.112, p.255-260, 1989.
- BURKETOVÁ, L.; STILLEROVÁ, K.; FELTLOVÁ, M. Immunohistological localization of chitinase and β -1,3-glucanase in rhizomania-diseased and benzothiadiazole treated sugar beet roots. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.63, p.47-54, 2003.

- CAIRNS, A.J. Fructan biosynthesis in transgenic plants. **Journal of Experimental Botany**, v.54, p.549-567, 2003.
- CAIRNS, A.J.; POLLOCK, C.J.; GALLAGHER, J.A.; HARRISON, J. Fructans: synthesis and regulation. In: LEEGOOD, R.C.; SHARKEY, T.D.; VON CAEMMERER, S. (Ed.). **Advances Photosynthesis: Physiology and Metabolism**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000, v.9, p.301-320.
- CARVALHO, M.A.M.; DIETRICH, S.M. Variation in fructan content in the underground organs of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby at different phonological phases. **New Phytologist**, v.123, p.735-740, 1993.
- CARVALHO, M.A.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Frutanos: ocorrência, estrutura e utilização, com ênfase em plantas do cerrado brasileiro. In: LAJOLO, F.M.; SAURA-CALIXTO, F.; WITTIG DE PENNA, E.; MENEZES, E.W. (Ed.). **Fibra dietética em Iberoamérica: Tecnologia y Salud**. Obtención, caracterización, efecto fisiológico y aplicación en alimentos. Projeto CYTEDXI.6, São Paulo: Editora Varela, 2001, p.77-90.
- CARVALHO, M.A.M.; ZAIDAN, L.B.P.; DIETRICH, S.M.C. Growth and fructan content of plants of *Vernonia herbacea* (Asteraceae) regenerated from rizophores. **New Phytologist**, v.136, p.153-161, 1997.
- CARVALHO, M.A.M.; PINTO, M.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Inulin production by *Vernonia herbacea* as influenced by mineral fertilization and time of harvest. **Revista Brasileira de Botânica**, v.21, p.281-285, 1998.

- CHATTERTON, N.J.; HARRISON, P.A.; BENNETT, J.H.; THORNLEY, W.R. Fructan, starch and sucrose concentration in crested wheat grass and redtop as affected by temperature. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.25, p.617-623, 1987.
- CHATTERTON, N.J.; HARRISON, P.A.; BENNETT, J.H.; ASAY, K.H. Carbohydrate partitioning in 185 accessions of gramineae grown under warm and cool temperatures. **Journal of Plant Physiology**, v.134, p.169-179, 1989.
- CLAESSENS, G.; VAN LAERE, A.; DE PROFT, M. Purification and properties of an inulinase from chicory roots (*Cichorium intybus* L.). **Journal of Plant Physiology**, v.136, p.35-39, 1990.
- CORNER, E.J.H. **The life of plants**. Weidenfeld & Nicholson, London: 1964, 156p.
- COUTINHO, L.M. O cerrado e a ecologia do fogo. **Ciência Hoje**, p.130-139, 1992. Número especial.
- CROWE, J.H.; HOEKSTRA, F.A.; CROWE, L.M. Anhydrobiosis. **Annual Review of Physiology**, v.54, p.579-599, 1992.
- CROWE, J.H.; HOEKSTRA, F.A.; NGUYEN, K.H.N.; CROWE, L.M. Is vitrification involved in depression of the phase transition temperature in dry phospholipids? **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1280, p.187-196, 1996.
- CUZZUOL, G.R.F.; CARVALHO, M.A.M.; BARBEDO, C.J.; ZAIDAN, L.B.P. Crescimento e conteúdo de frutanos em plantas de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby submetidas à adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, p.81-91, 2003.

- DE HALLEUX, S.; VAN CUTSEM, P. Cloning and sequencing of the 1-SST cDNA from chicory root (Accession nº U81520) (PGR97-036). **Plant Physiology**, v.113, p.1003, 1997.
- DE ROOVER, J.; VAN LAERE, A.; VAN DEN ENDE, W. Effect of defoliation on fructan pattern and fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (*Cichorium intybus*) L. **Physiologia Plantarum**, v.106, p.158-163, 1999.
- DE ROOVER, J.; VANDENBRANDEN, K.; VAN LAERE, A.; VAN DEN ENDE, W. Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose: sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Cichorium intybus* L.). **Planta**, v.210, p.808-814, 2000.
- DE VUONO, Y.S.; BATISTA, E.A.; FUNARI, F.L. Balanço hídrico na área da Reserva Biológica de Mogi-Guaçu, São Paulo – Brasil. **Hoehnea**, v.13, p.73-85, 1986.
- DEGASPERI, M.I.; ITAYA, N.M.; BUCKERIDGE, M.S.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Fructan degradation and hydrolytic activity in tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae), a herbaceous species from the cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, p.11-21, 2003.
- DEMEL, R.A.; DORREPAAL, E.; EBSKAMP, M.J.M.; SMEEKENS, J.C.M.; DE KRUIJFF, B. Fructans interact strongly with model membranes. **Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes**, v.1375, p.36-42, 1998.

- DIAS-TAGLIACOZZO, G.M.; DIETRICH, S.M.C.; MELLO-AIRES, M. Measurement of glomerular filtration rate using inulin prepared from *Vernonia herbacea*, a brazilian native species. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.29, p.1393-1396, 1996.
- DIETRICH, S.M.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Organos subterrâneos y propagacion vegetativa em plantas de los cerrados brasileiros. **Meio Ambiente**, v.7, p. 45-52, 1985.
- EAGLES, C.F. Variation in the soluble carbohydrate content of climate races of *Dactylis glomerata* (cocksfoot) at different temperatures. **Annals of Botany**, v.67, p.517-531, 1967.
- EDELMAN, J.; JEFFORD, T.G. The mechanism of fructose metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. **New Phytologist**, v.67, p.517-531, 1968.
- EDELMAN, J.; JEFFORD, T.G. The mechanism of fructose polymers in plants. 4. β -fructofuranosidases of tubers of *Helianthus tuberosus* L. **Biochemical Journal**, v.93, p.148-161, 1964.
- EITEN, G. The cerrado vegetation of Brazil. **Botanical Review**, v.38, p.201-341, 1972.
- FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; DIETRICH, S.M.C.; CHU, E.P.; CARVALHO, M.A.M.; VIEIRA, C.C.; GRAZIANO, T.T. Reserve carbohydrates in underground organs of native Brazilian plants. **Revista Brasileira de Botânica**, v.9, p.159-166, 1986.

- FREHNER, M.; KELLER, F.; WIENKEN, A. Localization of fructan metabolism in the vacuoles isolated from protoplasts of Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L.). **Journal Plant Physiology**, v.116, p.197-208, 1984.
- FUKAI, K.; OHNO, S.; GOTO, K.; NANJO, F.; HARA, Y. Seasonal fluctuations in fructan content and related enzyme activities in Yacon (*Polymnia sonchifolia*). **Soil Science Plant Nutrition**, v.43, p.171-177, 1997.
- GIAQUINTA, R.T. Translocation of sucrose and oligosaccharides. In: PREISS, J. (Ed.). **The Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, 1980, v.3, p. 271-320.
- GODFREY, T.; WEST, S. **Industrial Enzimology**. New York: Stockton Press, 1996. 609p.
- GONZALES, B.; BOUCAUD, J.; SALETTE, J.; LANGLOIS, J. Fructan and cryoprotection in ryegrass (*Lolium perenne* L.). **New Phytologist**, v.115, p.319-323, 1990.
- GOODLAND, R.A. A physiognomic analysis of the "Cerrado" vegetation of Central Brazil. **Journal of Ecology**, v.59, p.411-419, 1971.
- HELLWEGE, E.M.; CZAPLA, S.; JAHNKE, A.; WILLMITZER, L.; HEYER, A.G. Transgenic potato (*Solanum tuberosum*) tubers synthesize the full spectrum of inulin molecules naturally occurring in globe artichoke (*Cynara scolymus*) roots. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.97, p.8699-8704, 2000.

- HELLWEGE, E.M.; GRITSCHER, D.; WILLMITZER, L.; HEYER, A.G. Transgenic potato tubers accumulate high level of 1-kestose and nystose: functional identification of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase of artichoke (*Cynara scolymus*) blossom discs. **Plant Journal**, v.12, p.1057-1065, 1997.
- HELLWEGE, E.M.; RAAP, M.; GRITSCHER, D.; WILLMITZER, L.; HEYER, G. Differences in chain length distribution of inulin from *Cynara scolymus* and respective 1-FFT cDNAs. **FEBS Letters**, v.427, p.25-28, 1998.
- HENDRY, G.A.F. Evolutionary origins and natural functions of fructans - a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. **New Phytologist**, v.123, p.3-14, 1993.
- HENDRY, G.A.F. The ecological significance of fructan in a contemporary flora. **New Phytologist**, v.106, p.201-216, 1987.
- HENDRY, G.A.F.; WALLACE, R.K. The origin, distribution and evolutionary significance of fructans. In: SUZUKI, M.; CHATTERTON, N.J. (Ed.). **Science and Technology of Fructans**, Boca Raton: CRC Press, 1993, p.119-139.
- HETTWER, U.; GROSS, M.; RUDOLPH, K. Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. Phaseolicola. **Journal of Bacteriology**, v.177, p.2834-2839, 1995.
- HINCHA, D.K.; OLIVER, A.E.; CROWE, J.H. The effects of chloroplast lipids on the stability of liposomes during freezing and drying. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1368, p.150-160, 1998.

- HINCHA, D.K.; HELLWEGE, E.M.; HEYER, A.G.; CROWE, J.H. Plant fructans stabilize phosphatidylcholine liposomes during freeze-drying. **European Journal of Biochemistry**, v.267, p.535-540, 2000.
- HINCHA, D.K.; ZUTHER, E.; HELLWEGE, E.M.; HEYER, A. Specific effects of fructo- and gluco-oligosaccharides in the preservation of liposomes during drying. **Glycobiology**, v.12, p.103-110, 2002.
- HOEKSTRA, F.A.; GOLOVINA, E.A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, v.6, p.431-438, 2001.
- HOUSLEY, T.L.; POLLOCK, C.J. The metabolism of fructan in higher plants. In: SUZUKI, M.; CHATTERTON, N. J. (Ed.). **Science and Technology of Fructans**, Boca Raton: CRC Press, 1993. p.120-139.
- IIZUKA, M.; MINAMIURA, N.; OGURA, T. Utilization of fructan. In: OHNISHI, M. (Ed.). **Glycoenzymes**, Tokio: Japan Scientific Societies Press, 2000. p.241-258.
- INCOLL, L.D.; BONNETT, G.D. Fructans in the Compositae – a short review. In: CALIGARI, P.D.S.; HIND, D.J.N. (Ed.). **Compositae: Biology and Utilization**, Kew: Proceedings of the international Compositae Conference, 1996, v.2, p.401-413.
- ITAYA, N.M.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L.; BUCKERIDGE, M.S. Synthesis of fructans by fructosyltransferase from the tuberous roots of *Viguiera discolor* (Asteraceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, p.435-442, 1999.

- JAIME, L.; MARTÍNEZ F.; MARTÍN-CABREJAS, M.A.; MOLLÁ, E.; LÓPEZ-ANDRÉU, F.J.; WALDRON, K.W.; ESTEBAN, R.M. Study of total fructan and fructooligosaccharide content in different onion tissues. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.81, p.177-182, 2000.
- JEONG, B.; HOUSLEY, T.L. Fructan metabolism in wheat in alternating warm and cold temperatures. **Plant Physiology**, v.93, p.902-906, 1990.
- JERMYN, M.A. A new method for the determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. **Nature**, v.177, p.38-39, 1956.
- KANDLER, O.; HOPF, H. Occurrence, metabolism and function of oligosaccharides. In: PREISS, J. (Ed.). **The Biochemistry of Plants**, New York: Academic Press, 1980, v.3: Carbohydrates: Structure and Function. p.221-270.
- KANG, S.I.; KIM S.I. Molecular cloning and sequence analysis of an endo-inulinase gene from *Arthrobacter* sp. **Biotechnology Letters**, v.21, p.569-574, 1999.
- KEREPESI, I.; GALIBA, G.; BÁNYAI, E. Osmotic and salt stresses induced differential alteration in water-soluble carbohydrate content in wheat seedlings. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.5347-5354, 1998.
- KONSTANTINOVA, T.; PARVANOV, D.; ATANASSOV, A.; DJILIANOV, D. Freezing tolerant tobacco transformed to accumulate osmoprotectants. **Plant Science**, v.163, p.157-164, 2002.

- KOOPS A.; JONKER H. Purification and characterisation of the enzyme of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* Colombia. 2. Purification of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase and reconstitution of fructan synthesis in vitro with purified sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase and fructan: fructan 1-fructosyltransferase. **Plant Physiology**, v.100, p.1167-1175, 1996.
- KOSARIC, N.; COSENTINO, G.P.; WIECZOREK, A. The Jerusalem artichoke as an agricultural crop. **Biomass**, v.5, p.1-36, 1984.
- LEVITT, J. Chilling, freezing and high temperature stress. In: LEVITT, J. (Ed.). **Responses of plants to environmental stress**, New York: Academic Press, 1980, v.1. p.3-56.
- LIVINGSTON, D.P.; HENSON, C.A. Apoplastic sugars, fructans, fructanexohidrolase and invertase in winter oat: responses to second-phase cold hardening. **Plant Physiology**, v.116, p.403-408, 1998.
- LUSCHER, M.; ERDIN, C.; SPRENGER, N.; HOCHSTRASSER, U.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Inulin synthesis by a combination of purified fructosyltransferase from tubers of *Helianthus tuberosus*. **FEBS Letters**, v.385, p.39-42, 1996.
- LUSCHER, M.; HOCHSTRASSER, U.; VOGEL, G.; AESCHBACHER, R.; GALATI, V.; NELSON, C.J.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Cloning and functional analysis of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase from tall fescue. **Plant Physiology**, v.124, p.1217-1227, 2000.
- MANLY, B.F.J. **Multivariate statistical methods**. London: Chapman & Hall, 1994, 189p.

- MANTOVANI W. Composição e similaridade florística, fenologia e espectro biológico do Cerrado da Reserva Biológica de Moji-Guaçú, Estado de São Paulo. São Paulo, 1983. 147p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
- MANTOVANI, W.; MARTINS, F.R. Variações fenológicas das espécies do cerrado da Reserva Biológica de Mogi-Guaçú, Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v.11, p.101-112, 1988.
- MANZONI M.; CAVAZZONI V. Hidrolysis of Topinambur (Jerusalem Artichoke) fructans by extracellular inulinase of *Kluyveromces marxianus* var *bulgaricus*. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, v.54, p.311-315, 1992.
- MARX, S.P.; NÖSBERGER, J; FREHNER, M. Seasonal variation of fructan - β -fructosidase (FEH) activity and characterization of a β -(2-1)- linkage specific FEH from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*). **New Phytologist**, v.135, p.267-277, 1997a.
- MARX, S.P.; NÖSBERGER, J.; FREHNER, M. Hydrolysis of fructan in grasses: a β -(2-6) – linkage specific fructan- β -fructosidase from stubble of *Lolium perenne*. **New Phytologist**, v.135, p.279-290, 1997b.
- MEIER, H.; REID, J.S.G. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. In: LOEWUS, F.A.; TANNER, W. (Ed.). **Encyclopedia of plant physiology**. New series, v. 13A. Plant carbohydrates I, London: Springer-Verlag, 1982, p.418-471.

- MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J.M.; WALTER, B.M.T.; JUNIOR, M.C.S.; REZENDE A.V.; FILGUEIRAS, T.S.; NOGUEIRA, P.E. Flora Vascular do Cerrado In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. (Ed.). **Cerrado: Ambiente e Flora**, Planaltina: Embrapa, 1998. p.290-301.
- MINO, Y.; SHIMADA, A.; YAMAMOTO, S. Effect of cutting height on the carbohydrate metabolism in haplocorn of timothy (*Phleum pratense* L.). **Journal of the Japanese Society of Grassland Science**, v.24, p.34-39, 1978.
- MONASTERIO, M.; SARMIENTO, G. Phenological strategies of plant species in tropical savanna and the semi-deciduous forest of the Venezuelan llanos. **Journal of Biogeography**, v.3, p.325-356, 1976.
- MORVAN, A.; CHALLE, G.; PRUD'HOMME, M.P.; LE SAOS, J.; BOUCAD, J. Rise of fructanexohydrolase activity in stubble of *Lolium perenne* after defoliation is decreased by uniconazole, an inhibitor of the biosynthesis of gibberellins. **New Phytologist**, v.136, p.81-88, 1997.
- NAKAMURA, T.; OGATA, Y.; SHITARA A.; NAKAMURA A.; OTHA, K. Continuous production of fructose syrups from inulin by immobilized inulinase from *Aspergillus niger* Mutant 817. **Journal Fermentation Bioengineering**, v.80, p.164-169, 1995.
- NGUYEN, Q.D.; MATTES, F.; HOSCHKE, A.; REZESSY-SZABÓ, J.; BHAT, M.K. Production, purification and identification of fructooligosaccharides produced by β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* IMI303386. **Biotechnology Letters**, v.21, p.183-186, 1999.

- OLIVEIRA, P.E. Fenologia e biologia reprodutiva das espécies de cerrado. In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**, Planaltina: Embrapa, 1998. p.170-192.
- OLIVER, A.E.; HINCHA, D.K.; CROWE, J.H. Are sugars sufficient for preservation of anhydrobiotes? Preventing adventitious reactions at low water contents by amphiphilic solutes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.131, p.515-525, 2001.
- ORTHEN, B. Sprouting of the fructan- and starch-storing geophyte *Lachenalia minima*: effects on carbohydrate and water content within the bulbs. **Physiologia Plantarum**, v.113, p.308-314, 2001.
- PANDEY, A.; SOCOL, C.R.; SELVAKUMAR, P.; SOCOL, V.T.; KRIEGER, N.; FONTANA, J.D. Recent developments in microbial inulinases. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.81, p.35-52, 1999.
- PAVIS, N.; BOUCAD, J.; PRUD'HOMME, M.P. Immediate effects of defoliation on fructan and fructan exohydrolase activity in *Lolium perenne*. FUCHS, A.; VAN LAERE, A. (Ed.). Seminar On Inulin, 7. **Proceedings**. Leuven: European Fructan Association, 1998.
- PAVIS, N.; BOUCAUD, J.; PRUD'HOMME, M.P. Fructan and fructan-metabolizing enzymes in leaves of *Lolium perenne*. **New Phytologist**, v.150, p.97-109, 2001.
- PENSON, S.P.; CAIRNS, A.J. Fructan biosynthesis in excised leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.): a comparison of the novo synthesis *in vivo* and *in vitro*. **New Phytologist**, v.128, p.395-402, 1994.

- PILON-SMITS, E.A.H.; EBSKAMP, M.J.M.; PAUL, M.J.; JEUKEN, M.J.W.; WEISBEEK, P.J.; SMEEKENS, S.C.M. Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. **Plant Physiology**, v.107, p.125-130, 1995.
- PILON-SMITS, E.A.H.; TERRY, N.; SEARS, T.; VAN DUN, K. Enhanced drought resistance in fructan-producing sugar beet. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.37, p.313-317, 1999.
- POLLARD, C.J.; AMUTI, K.S. Fructose oligosaccharides, possible markers of phylogenetic relationships among dicotyledonous plant families. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.9, p.69-78, 1981.
- POLLOCK, C.J.; CHATTERTON, N.J. Fructans. In: PREISS, J. (Ed.). **The Biochemistry of Plants** – A Comprehensive Treatise, New York: Academic Press, 1988, v.14 - Carbohydrates: Structure and Function. p.109-140.
- POLLOCK, C.J. Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. **New Phytologist**, v.104, p.1-24, 1986.
- POLLOCK, C.J.; CAIRNS, A.J. Fructan metabolism in grasses and cereals. **Annual Review of Plant Physiology and Plant molecular Biology**, v.42, p.77-101, 1991.
- POLLOCK, C.J.; CAIRNS, A.J.; SIMS, I.M.; HOUSLEY, T.L. Fructan as Reserve Carbohydrates in Crop Plants. In: ZAMSKI, E.; SHAFFER, A.A. (Ed.). Photoassimilate distribution in plants and crops: source – Sink relationships, New York: A.A. Marcel Dekker, 1996. p.97-113.

- PONTIS, H.G. Fructans and cold stress. **Journal of Plant Physiology**, v.134, p.148-150, 1989.
- PONTIS, H.G.; DEL CAMPILLO, E. Fructans. In: DEY, P.M.; DIXON, R. (Ed.). **Biochemistry of storage carbohydrates in green plants**, London: Academic Press, 1985. p.205-227.
- PORTES, M.T.; CARVALHO, P.G.; CARVALHO, M.A.M. Variação sazonal no metabolismo de frutanos em rizóforos de *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (Asteraceae). In: Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo 14., Rio Claro, SP. 2002; **Proceeding**. São Paulo: Sociedade Botânica de São Paulo. 2002.
- PRAZNIK, W.; BECK, H.F. Application of gel permeation chromatographic systems to the determination of the molecular weight of inulin. **Journal of Chromatography**, v.348, p.187-197, 1985.
- PREISS, J.; LEVI, C. Starch biosynthesis and degradation. In: PREISS, J. (Ed.). **The Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press, 1980. v.3. p.371-423.
- PRUD'HOMME, M.P.; GONZALEZ, B.; BILLARD, J.P.; BOUCAUD, J. Carbohydrate content, fructan and sucrose enzyme activities in roots, stubble and leaves of ryegrass (*Lolium perenne*) as affected by source/sink modification after cutting. **Journal of Plant Physiology**, v.140, p.282-291, 1992.
- PRUD'HOMME, M.P.; CASTAL, F.; BELANGER, G.; BOUCAUD, J. Temperature effects on partitioning of ^{14}C assimilates in tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb). **New Phytologist**, v.123, p.255-261, 1993.

- PUEBLA, A.F.; SALERNO, G.; PONTIS, H.G. Fructan metabolism in two species of *Bromus* subjected to chilling and water stress. **New Phytologist**, v.136, p.123-129, 1997.
- RACHID, M. Transpiração e sistemas subterrâneos da vegetação de verão nos Campos Cerrados de Emas. Bolm. Fac. Fil. Ciênc. Letras, USP 80, **Botânica**, v.5, p.5-140, 1947.
- RAWITSCHER, F. The water economy of the vegetation of the "campos cerrados" in Southern Brazil. **Journal of Ecology**, v.36, p.237-268, 1948.
- RIBEIRO, J.F.; WALTER, B.M.T. Fitofisionomias do bioma cerrado In: SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. (Ed.). **Cerrado**: ambiente e flora, Planaltina: Embrapa, 1998. p.87-166.
- RIBEIRO-SOBRINHO, D.S.; BUCKERIDGE, M.S.; CARVALHO, M.A.M. Fructan hydrolase from rhizophores of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby and its role in fructan mobilization. In: International Fructan Conference, 3., Utah, 1996. **Resumos**. Utah: International Fructan, 1996. p.45.
- RITSEMA, T.; SMEEKENS, S.C.M. Engineering fructan metabolism in plants. **Journal of Plant Physiology**, v.160, p.811-820, 2003.
- RUTHERFORD, P.P.; DEACON, A.C. Seasonal variation in dandelion roots of fructosan composition, metabolism and response to treatment with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Annals of Botany**, v.38, p.251-260, 1974.
- SANTOIANI, C.S.; TOGNETTI, J.A.; PONTIS, H.G.; SALERNO, G.L. Sucrose and fructan metabolism in wheat roots at chilling temperatures. **Physiologia Plantarum**, v.87, p.84-88, 1993.

- SARMIENTO, G.; MONASTERIO, M. Life forms and phenology. In: BOULIERE, F. (Ed.). **Ecosystems of the world: tropical savannas**, Amsterdam: Elsevier, 1983. p.79-108.
- SIMMEN, U.; OBENLAND, D.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Fructan synthesis in excised barley leaves. **Plant Physiology**, v.101, p.459-468, 1993.
- SIMPSON, R.J.; BONNETT, G.D. Fructan exohydrolase from grasses. **New Phytologist**, v.123, p.453-469, 1993.
- SIMPSON, R.J.; WALKER, R.P.; POLLOCK, C.J. Fructan exohydrolase activity in leaves of *Lolium temulentum* L. **New Phytologist**, v.119, p.527-536, 1991.
- SMART, D.R.; CHATTERTON, N.J.; BUGBEE, B. The influence of elevated CO₂ on non-structural carbohydrate distribution and fructan accumulation in wheat canopies. **Plant Cell and Environment**, v.17, p.435-442, 1994.
- SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v.160, p.61-63, 1945.
- SPRENGER, N.; BORTLIK, K.; BRANDT, A.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Purification, cloning and functional expression of sucrose: fructan 6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.92, p.11652-11656, 1995.
- STEPONKUS, P.L. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. **Annual Review of Plant Physiology**, v.35, p.543-584, 1984.

- SUSUKI, M. Fructans in forage grasses with varying degrees of cold hardiness. **Journal of Plant Physiology**, v.134, p.224-231, 1989.
- TEIXEIRA, P.G.; CARVALHO, M.A.M.; ZAIDAN, L.B.P.; KLEIN, A.L. Effect of mineral nutrients on growth and fructan contents in plants of *Vernonia herbacea*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.9, p.89-96, 1997.
- TERTULIANO, M.F.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. Distribution of fructose polymers in herbaceous species of Asteraceae from the cerrado. **New Phytologist**, v.123, p.741-749, 1993.
- TSVETKOVA, N.M.; PHILLIPS, B.L.; CROWE, L.M.; CROWE, J.H.; RISBUD, S.H. Effect of sugars on headgroup mobility in freeze-dried dipalmitoyl-phosphatidylcholine bilayers: solid-state ³¹P NMR and FTIR studies. **Biophysical Journal**, v.75, p.2947-2955, 1998.
- VÁGÚJFALVI, A.; KEREPESI, I.; GALIBA, G.; TISCHNER, T.; SUTKA, J. Frost hardiness depending on carbohydrate changes during cold acclimation in wheat. **Plant Science**, v.144, p.85-92, 1999.
- VAN DEN ENDE W.; VAN LAERE, A. *De-novo* synthesis of fructans from sucrose *in vitro* by a combination of two purified enzymes (sucrose:sucrose fructosyltransferase and fructan:fructan fructosyltransferase) from chicory roots (*Cichorium intybus* L.). **Planta**, v.200, p.335-342, 1996a.
- VAN DEN ENDE W.; VAN LAERE, A. Fructan synthesizing and degrading activities in chicory roots (*Cichorium intybus* L.) during field-growth, storage and forcing. **Journal of Plant Physiology**, v.149, p.43-50, 1996b.

- VAN DEN ENDE W.; DE CORNINCK, B.; VAN LAERE, A. Plant fructan exohydrolase: a role in signaling and defense? **Trends in Plant Science**, v.9, p.523-528, 2004.
- VAN DEN ENDE, W.; MICHIELS, A.; DE ROOVER, J.; VAN LAERE, A. Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of fructan genes throughout chicory development. **The Scientific World JOURNAL**, v.2, p.1281-1295, 2002.
- VAN DEN ENDE, W.; MICHIELS, A.; DE ROOVER, J.; VERHAERT, P.; VAN LAERE, A. Cloning and functional analysis of chicory root fructan 1-exohydrolase I (1-FEHI): a vacuolar enzyme derived from a cell wall invertase ancestor? Mass fingerprint of the 1-FEHI enzyme. **Plant Journal**, v.24, p.447-456, 2000a.
- VAN DEN ENDE, W.; MICHIELS, A.; VAN WONTERGHEM, D.; VERGAUWEN, R.; VAN LAERE, A. Cloning, developmental and tissue-specific expression of sucrose:sucrose 1-fructosyl transferase from *Taraxacum officinale*. Fructan localization in roots. **Plant Physiology**, v.123, p.71-79, 2000b.
- VAN DEN ENDE W.; DE CORNINCK, B.; CLERENS, S.; VERGAUWEN, R.; VAN LAERE, A. Unexpected presence of fructan 6-exohydrolase (6-FEHs) in non-fructan plants: characterization, cloning, mass mapping and functional analysis of a novel 'cell-wall invertase-like' specific 6-FEH from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). **The Plant Journal**, v.36, p.697-710, 2003b.

- VAN DEN ENDE, W.; MICHIELS, A.; VAN WONTERGHEM, D.; CLERENS, S.; DE ROOVER, J.; VAN LAERE, A. Defoliation induces 1-FEHII (fructan 1-exohydrolaseII) in witloof chicory roots. Cloning and purification of two isoforms (1-FEHIIa and FEHIIb). Mass fingerprint of the 1-FEHII enzymes. **Plant Physiology**, v.126, p.1186-1195, 2001.
- VAN DEN ENDE W.; CLAERENS, S.; VERGAUWEN, R.; VAN RIET, L.; VAN LAERE, A.; YOSHIDA, M.; KAWAKAMI, A. Fructan 1-exohidrolases. β -(2,1)-trimmers during graminan biosíntesis in stems of wheat? Purification, characterization, mass mapping and cloning of two fructan 1-exohydrolase isoforms. **Plant Physiology**, v.131, p.621-631, 2003a.
- VAN DER MEER, I.M.; KOOPS, A.J.; HAKKERT, J.C.; VAN TUNEN, A.J. Cloning of the fructan biosynthesis pathway of Jerusalem artichoke. **Plant Journal**, v.15, p.489-500, 1998.
- VAN LAERE, A.; VAN DEN ENDE, W. Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. **Plant, Cell and Environment**, v.25, p.803-813, 2002.
- VEREYKEN, I.J.; CHUPIN, V.; DEMEL, R.A.; SMEEKENS, S.C.M.; KRUIJFF, B.D. Fructans insert between the headgroups of phospholipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1510, p.307-320, 2001.
- VERGAUWEN R.; VAN DEN ENDE W.; VAN LAERE A. The role of fructans in flowering of *Campanula rapunculoides*. **Journal of Experimental Botany**, v.51, p.1261-1266, 2000.

- VERGAUWEN R.; VAN DEN ENDE W.; VAN LAERE A. Properties of fructan:fructan 1-fructosyltransferases from chicory and globe thistle, two Asteracean plants storing greatly different types of inulin. **Plant Physiology**, v.133, p.391-401, 2003.
- VIJN, I.; SMEEKENS, S. Fructan: more than a reserve carbohydrate? **Plant Physiology**, v.120, p.351-359, 1999.
- VIJN, I.; VAN DIJKEN, A.; LÜSCHER, M.; BOS, A.; SMEETS, E.; WEISBEEK, P.; WIEMKEN, A.; SMEEKENS, S. Cloning of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase from onion and synthesis of structurally defined molecules from sucrose. **Plant Physiology**, v.117, p.1507-1513, 1998.
- VIJN, L. VAN DIJKEN, A.; SPRENGER, N.; VAN DUN, K.; WEISBEEK, P.; WIEMKEN, A.; SMEEKENS, S. Fructan of the inulin neoseries is synthesized in transgenic chicory plants (*Cichorium intybus*) harbouring onion (*Allium cepa*) fructan: fructan 6G fructosyltransferase. **Plant Journal**, v.11, p.387-398, 1997.
- WAGNER, W.; WIEMKEN, A. Properties and subcellular localization of fructan hydrolase in the leaves of barley (*Hordeum vulgare* L. cv Gerbel). **Journal of Plant Physiology**, v.123, p.419-428, 1986.
- WANG, C.; VAN DEN ENDE, W.; TILLBERG, J.E. Fructan accumulation induced by nitrogen deficiency in barley leaves correlates with the level of sucrose: fructan 6-fructosyltransferase mRNA. **Planta**, v.211, p.701-707, 2000.
- WARMING, E. Lagoa Santa: contribuição para a Geografia Phytobiologica. Belo Horizonte: Imprensa oficial do Estado de Minas Geraes, 1908. (Tradução de Lagoa Santa – et Bidrad til den Biologiske Plantegeographi, Kjobenhavn, 1982)

- WARREN, G.J. Manipulating freezing tolerance in plant. **Current Biology**, v.8, p.514-516, 1998.
- WIEMKEN, A.; SPRENGER, N.; BOLLER, T. Fructans – an extension of sucrose by sucrose. In: PONTIS, H.G.; SALERNO, G.L.; ECHEVERRIA, E.J. (Ed.). **Current Topics in Plant Physiology**, Rockville, 1995. v.14, p.179-189.
- WIEMKEN, A.; FREHNER, M.; KELLER, F.; WAGNER, W. Fructan metabolism, enzymology and compartmentation. **Current Opinion in Plant Biochemistry and Physiology**, v.5, p.17-37, 1986.
- YAMAMOTO, S.; MINO, Y. Effect of sugar level on phleinsase induction in stem base of orchardgrass after defoliation. **Physiologia Plantarum**, v.69, p.456-460, 1987.